

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Barbora Čápová

Diferenciace lidských M2 monocytů/makrofágů
a jejich úloha u transplantací ledvin

Differentiation of human M2 monocytes/macrophages
and their role in kidney transplantation

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: prof. MUDr. Ilja Stříž, CSc.

Praha 2019

Charles University

Faculty of Science

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne:

.....

Barbora Čápová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. MUDr. Iljovi Střížovi, CSc., za odborné vedení diplomové práce, cenné rady a čas, který mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kristýně Kotschwarové, DiS., Mgr. Lence Čurnové a Mgr. Martině Fialové za uvedení do problematiky, trpělivost a přátelský přístup po celou dobu mého studia.

Tato práce byla finančně podpořena grantem: Regulační mechanismy buněk přirozené imunity u transplantace ledviny (AZV - MZ 15-26883A).

Abstrakt

Mezi mononukleární fagocyty patří makrofágy, které mohou modulovat svůj fenotyp na základě signálů z prostředí. V diferenciovaném stádiu se jejich vlastnosti značně liší. M1 makrofágy, které jsou klasicky aktivované (zejména IFN- γ), se podílí na fagocytóze a produkují některé prozánětlivé cytokiny, které mohou stimulovat další imunitní buňky. Fenotypicky odlišnou buněčnou populací jsou M2 makrofágy, které vznikají alternativní cestou, hlavně působením Th2 cytokinů. M2 makrofágy produkují především protizánětlivé cytokiny IL-10 a TGF- β a účastní se reparačních procesů a hojení tkáně. Cílem této práce bylo na *in vitro* modelu standardizovat model diferenciaci THP-1 buněk a lidských monocytů směrem k M2 fenotypu. Ten je představován zejména zvýšenou expresí molekul CD163 a CD206. Druhým cílem bylo posoudit dynamiku exprese (a koexprese) molekul CD163 a CD206 na monocytech pacientů po transplantaci ledvin. Exprese povrchových znaků byla stanovena metodou průtokové cytometrie. THP-1 buňky i lidské monocyty izolované z *buffy coatu* byly stimulovány IL-4, TNF- α , TGF- β a IL-10. Změny exprese znaků CD163 a CD206 byly měřeny po 1,3 a 6 dnech od stimulace. Nejvýznamnějších změn exprese bylo dosaženo stimulací monocytů izolovaných z *buffy coatu* pomocí IL-10. Ke zvýšení exprese znaku CD206 došlo také při stimulaci těchto monocytů pomocí IL-4. THP-1 buňky se v této práci neprokázaly jako vhodný model pro modulaci směrem k M2 fenotypu, protože naměřené hodnoty nebyly reprodukovatelné. Exprese molekul CD163, CD206 a CD209 byla zkoumána také *in vivo* u pacientů před a po transplantaci ledvin. Zjištěn byl především významný nárůst exprese CD163⁺ buněk po transplantaci ledvin, zatímco exprese molekuly CD206 se po transplantaci výrazně nezměnila. Zdá se, že detekce znaku CD163 by mohla být diagnosticky významná u potransplantační rejekce a indukce CD163⁺ buněk by mohla mít pozitivní vliv na hojení tkáně a reparační procesy u některých patologických stavů.

Klíčová slova

monocyty, makrofágy, THP-1 buňky, ledviny, transplantace, rejekce, cytokiny

Abstract

The system of mononuclear phagocytes includes macrophages that modulate their phenotype based on microenvironmental signals. Their properties vary considerably in a differentiated stage. M1 macrophages, which are classically activated (typically by IFN- γ), are involved in phagocytosis and produce some pro-inflammatory cytokines, that can stimulate other immune cells. A phenotypically different cell population are M2 macrophages, which are alternatively activated by exposure by Th2 cytokines. M2 macrophages produce preferentially anti-inflammatory cytokines IL-10, TGF- β and participate in repair and tissue healing. The main aim of this study was to standardize a model of differentiation of THP-1 cells and human monocytes towards the M2 phenotyp using an *in vitro* model. This is represented in particular by increased expression of CD163 and CD206 molecules. The second aim was to assess the dynamics of expression (and co-expression) of CD163 and CD206 molecules in monocytes of patients after kidney transplantation. Expression of surface markers was determined by flow cytometry. Both THP-1 cells and human monocytes, isolated from buffy coat fraction, were stimulated by IL-4, TNF- α , TGF- β and IL-10. Changes in CD163 and CD206 expression were measured after day 1, day 3 and day 6 of stimulation. The most significant changes in expression were achieved by stimulation of monocytes, isolated from buffy coat fraction, by IL-10. The increase in CD206 expression also occurred after stimulating these monocytes with IL-4. THP-1 cells have shown not to be a suitable model for modulation towards the M2 phenotype in this study, because the measured values were not reproducible. Expression of CD163, CD206 and CD209 molecules was also investigated *in vivo* in patients before and after kidney transplantation. There was a significant increase in CD163⁺ cell population after renal transplantation, whereas expression of the CD206 molecule did not change significantly after transplantation. Detection of marker CD163 is supposed to be of diagnostic significance in rejection after transplantation and CD163⁺ cells induction might have a positive effect on tissue healing and repair processes in some diseases.

Key words

monocytes, macrophages, THP-1 cells, kidney, transplantation, rejection, cytokines

Obsah

1 Úvod.....	7
2 Teoretická část	9
2.1 Mononukleární fagocytární systém	9
2.1.1 Vývoj monocyťů a makrofágů	9
2.1.2 Struktura monocyťů a makrofágů	10
2.1.3 Subpopulace monocyťů.....	11
2.1.4 Funkce makrofágů	12
2.1.5 Receptory makrofágů.....	13
2.1.6 Subpopulace makrofágů	15
2.2 Sledované cytokiny a povrchové znaky buněk.....	19
2.2.1 Cytokiny.....	19
2.2.2 CD znaky	22
2.3 Transplantace ledvin.....	24
2.3.1 Počátky transplantační imunologie.....	25
2.3.2 Transplantační imunologie – rejekce ledvin.....	25
2.3.3 Mononukleární fagocyty při rejekci ledvin	26
3 Cíle práce	28
4 Materiál a metody	29
4.1 Použitý materiál a přístroje	29
4.1.1 Modelové buňky	29
4.1.2 Chemikálie	29
4.1.3 Přístroje.....	29
4.2 THP-1 buňky.....	30
4.2.1 Rozmrazení THP-1 buněk	30
4.2.2 Pasážování THP-1 buněk.....	30
4.3 Monocyty izolované z krevní složky <i>buffy coat</i>	31

4.3.1 Izolace monocytů z <i>buffy coatu</i>	31
4.4 Měření životnosti buněk	32
4.5 Diferenciace THP-1 buněk a izolovaných monocytů z krevní složky <i>buffy coat</i> ..	34
4.6 Průtoková cytometrie	37
4.6.1 Značení buněk pro průtokovou cytometrii.....	38
4.6.2 „Gateovací“ strategie pro monocyty izolované z krevní složky <i>buffy coat</i> ..	39
4.6.3 „Gateovací“ strategie pro THP-1 buňky	40
5 Výsledky	42
5.1 Životnost stimulovaných monocytů sledovaná pomocí průtokové cytometrie navázáním 7-AAD	42
5.2 Povrchová exprese sledovaných znaků na stimulovaných monocytech izolovaných z <i>buffy coatu</i>	42
5.3 Povrchová exprese sledovaných znaků na stimulovaných THP-1 buňkách.....	47
5.4 Povrchová exprese sledovaných znaků u pacientů před a po transplantaci ledvin	51
6 Diskuze	54
7 Závěr	59
9 Seznam použité literatury	63

1 Úvod

Imunitní systém se podílí na rozpoznávání a eliminaci patogenních mikroorganismů a nádorových buněk, čímž zabraňuje rozvoji mnoha nemocí. Patogenní molekuly se specifickými vzory (*pathogen-associated molecular patterns*; PAMP) jsou rozpoznávány pomocí receptorů specifických pro molekulární vzory (*pattern recognition receptors*; PRR). PRR jsou buď vázány na cytoplazmatickou membránu (Toll-like receptory a C-lektinové receptory) nebo se vyskytují v cytoplazmě (NOD-like receptory a RIG-like receptory). Makrofágy hrají v imunitním systému významnou roli. Jsou to evolučně velmi staré buňky s vysokou plasticitou, mezi jejichž hlavní funkce patří fagocytovat mikroorganismy a vlastní odumřelé buňky organismu a také produkovat některé cytokiny. V organismu cirkulují v krevním oběhu nebo se vyskytují jako rezidenční makrofágy v orgánech jako jsou játra, plíce, mozek, kostní tkáň, kůže, tuková tkáň nebo peritoneální dutina.

Jsou známy minimálně dva typy aktivovaných makrofágů. Prozánětlivé makrofágy typu M1 vznikají pod vlivem interferonu gamma (IFN- γ). Fagocytují a degradují poškozené buňky a imunokomplexy v místě zánětu a produkují cytokin IL-12, který stimuluje T-lymfocyty a *natural killer* buňky (NK buňky). Alternativní cestou vznikají pod vlivem IL-4 a IL-13 z klidových makrofágů buňky M2 typu. M2 makrofágy mají zejména protizánětlivou funkci – produkují IL-10 a transformující růstový faktor β (TGF- β), aktivují fibroblasty, napomáhají angiogenezi a tím regenerují poškozenou tkáň. Makrofágy typu M2 často infiltrují nádory, označují se jako makrofágy asociované s tumorem (TAM). Poruchou plasticity makrofágů může dojít k porušení imunitní odpovědi a rozvoji rakoviny, bronchiálního astmatu nebo aterosklerózy. Tyto makrofágy se ve tkáni vyznačují nejčastěji zvýšenou expresí znaků CD163 nebo CD206 (popř. obou).

Makrofágy u transplantací ledvin jsou zkoumány z několika důvodů. Úspěch transplantace ledviny je kromě adaptivní odpovědi příjemce proti štěpu, závislý také na činnosti buněk tlumících imunitu. Dosud byla pozornost věnována převážně T-regulačním lymfocytům (Treg) a B-regulačním lymfocytům (Breg), ale zatím bylo zjištěno minimum informací o úloze M2 makrofágů. Dále byla v publikované pilotní studii zjištěna výrazná indukce CD163+ (CD = *cluster of differentiation*) monocytů po transplantaci ledviny, ale není prokázáno, zda tento typ monocytů funkčně odpovídá M2

makrofágům. Není také jasné, čím je tento fenotyp indukován, zda alloreaktivitou, imunosupresí nebo třeba cytokiny.

2 Teoretická část

2.1 Mononukleární fagocytární systém

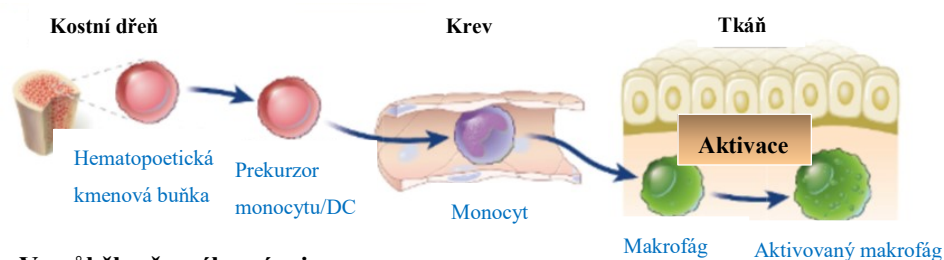
Mononukleární fagocytární systém (MPS) zahrnuje jednojaderné buňky, jejichž hlavními funkcemi jsou fagocytóza, produkce cytokinů a antigenní prezentace. Mezi tyto buňky patří myeloidní prekursor buněk kostní dřeně, monocyty periferní krve, tkáňové makrofágy a dendritické buňky (DC) monocytárního původu. Zda se monocyty diferencují na makrofágy nebo na DC, záleží na signálech z mikroprostředí a na lokalizaci těchto buněk (Jenkins, 2014). Původně MPS sestával z monocytů, DC a makrofágů na základě podobné funkce nebo fenotypu. Tyto charakteristiky se ovšem často překrývají. Novějším návrhem je, klasifikovat tyto buňky primárně podle jejich původu a druhotně podle jejich lokalizace (Guilliams et al. 2014).

2.1.1 Vývoj monocytů a makrofágů

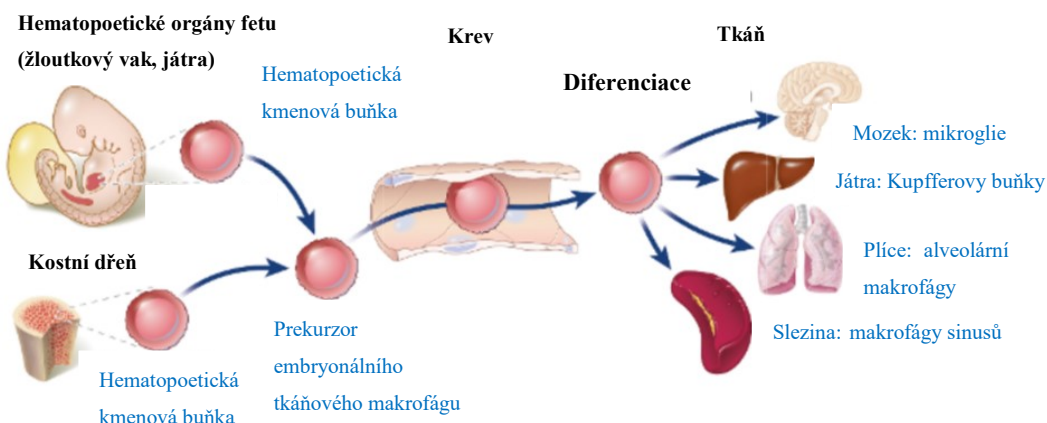
Vývoj monocytů/makrofágů (viz obr.1) začíná u dospělých jedinců z prekursorů v kostní dřeni. Je řízen monocyty (nebo makrofágy) – kolonie stimulujícím faktorem (M-CSF). Z těchto prekursorů se stávají monocyty, které vstupují do krevního oběhu. Zejména při probíhající zánětu monocyty prostupují do tkání, kde se diferencují v makrofágy. Tkáňové rezidentní makrofágy vznikají z prekursorů již v průběhu fetálního vývoje. Tyto prekursor pochází z kostní dřeně, žloutkového vaku nebo jater plodu. Fenotyp tkáňové rezidentních makrofágů odpovídá jejich cílovému orgánovému umístění. V mozku se makrofágy diferencují v mikrogliální buňky, v játrech v Kupfferovy buňky. V plicích se nachází alveolární makrofágy a tkáňově specifické jsou také makrofágy sleziny (Abbas et al. 2017).

Monocyty se musí neustále obměňovat. Buňky diferencované z hematopoetické kmenové buňky se obměňují průběžně za klidového stavu organismu i v reakci na zánět. Tkáňové makrofágy embryonálního původu se obnovují nezávisle na kmenových buňkách, přičemž není za potřebí progenitorů. Zralé makrofágy jsou totiž schopné proliferovat na základě působení určitých stimulů, intracelulárních i extracelulárních cytokinů (Sieweke a Allen 2013).

V klidovém stavu a při zánětlivých reakcích u dospělých



V průběhu časného vývoje



Obrázek 1 – Maturace mononukleárních fagocytů (Upraveno dle: Abbas et al. 2017)

2.1.2 Struktura monocytů a makrofágů

Monocyty jsou buňky o velikosti 10 až 15 μm v průměru. Obsahují jádro fazolovitého tvaru, uvnitř kterého se nachází jadérko a celé jádro je obklopeno cytoplazmou. V cytoplazmě se nachází mnoho mitochondrií, mikrotubulů a mikrofilament. Golgiho aparát je velmi dobře vyvinutý a okolo něj jsou četné centrioly. V cytoplazmě jsou rozptýlená granula, která jsou podobná lyzozomům. Složení těchto granul je velice podobné složení granul neutrofilů, ale monocytární granula obsahují esterázy, které inhibují fluorid. Při diferenciaci monocytů v makrofágy narůstá objem těchto buněk a počet granul v cytoplazmě (Kaushansky et al. 2016).

Makrofágy se mohou lišit tvarově, funkčně i složením podle toho, pro kterou tkáň jsou specifické. Pro tyto buňky je typická fúze lyzozomů s fagozomy za vzniku sekundárních lyzozomů, ve kterých se nachází pohlcený materiál určený k degradaci. Na povrchu makrofágů je široké spektrum receptorů vážících různé typy ligandů. Monocyty tvoří heterogenní skupinu skládající se z různých subtypů. Jednotlivé subtypy monocytů jsou morfologicky stejné, ale mají různou funkci a liší se přítomností různých povrchových receptorů (Murphy a Weaver 2017).

2.1.3 Subpopulace monocytů

Monocyty periferní krve tvoří heterogenní skupinu, kterou lze rozdělit pomocí průtokové cytometrie do 3 hlavních fenotypově odlišných skupin (viz obr. 2). Buňky jsou děleny na základě přítomnosti povrchových znaků CD14 a CD16. Molekula CD14 představuje pomocný receptor pro navázání bakteriálního lipopolysacharidu (LPS), zatímco molekula CD16 je receptorem pro konstantní část (Fc část) protilátky IgG (Sekerková et al. 2014).

a) Klasické, prozánětlivé monocyty ($CD14^+CD16^-$)

První skupinu tvoří tzv. klasické monocyty, které produkují prozánětlivé mediátory. Tyto klasické (prozánětlivé) monocyty mají zejména fagocytární funkci a pokud dojde v organismu k zánětu, tak jsou rychle povolávány do místa infekce nebo tkáňového poškození. Nacházejí se také ve slezině, odkud jsou v případě infekce připraveny zasáhnout. Pro subtyp klasických monocytů je typická vysoká exprese molekuly CD14 a téměř žádná exprese molekuly CD16. Na jejich povrchu je přítomen chemokinový receptor CCR2 (chemokinový receptor s C-C motivem) (Ziegler-Heitbrock 2015).

b) Neklasické monocyty ($CD14^{low}CD16^+$)

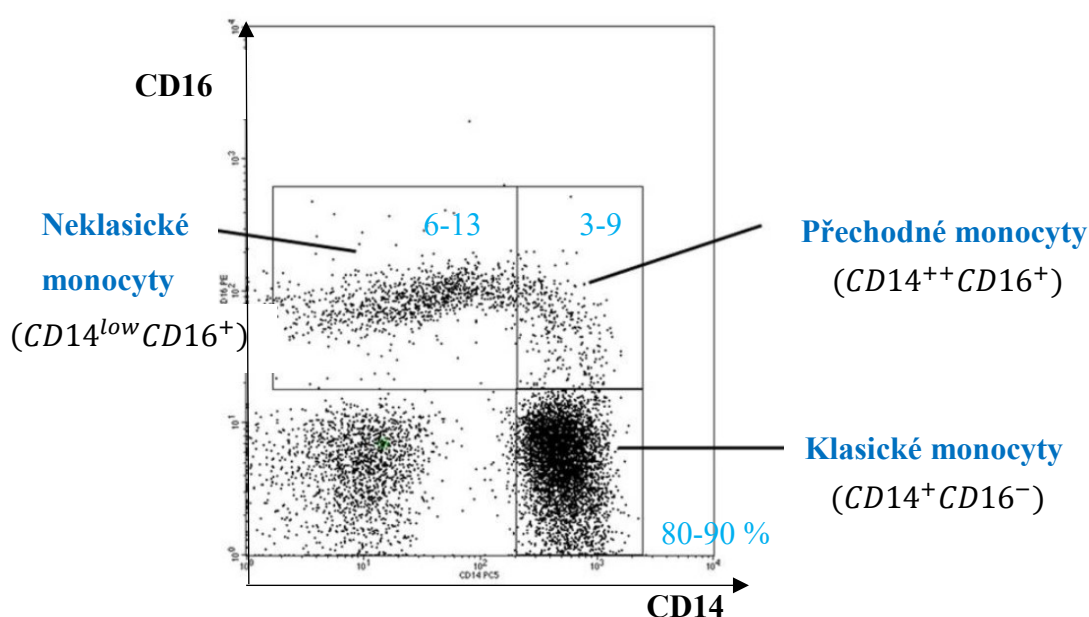
Další méně početnou skupinou jsou tzv. neklasické monocyty. Neklasické monocyty vykazují nízkou expresi molekuly CD14 a vysokou expresi molekuly CD16. Typická je také přítomnost chemokinového receptoru CX3CR1 (chemokinový receptor s C-X3-C motivem). Tyto monocyty nacházejí uplatnění u různých zánětlivých stavů. Odstraňují poškozené buňky a debris z cév a podílí se na reparačních procesech (Owen et al. 2013).

Pro neklasické monocyty je charakteristická jistá dohledová funkce (tzv. *patrolling*) nad cévním endotelem, jak při hematopoéze, tak během zánětu. Neklasické monocyty se pohybují podél endotelu rychlostí 12 $\mu\text{m}/\text{min}$ (tato rychlost nezáleží na rychlosti toku krve) a podléhají diapedéze, takže je lze najít i v aterosklerotických plátech nebo v parenchymu různých tkání. Tato funkce neklasických monocytů vyžaduje vazbu molekul LFA-1 (antigen asociovaný s funkcí lymfocytů) s ICAM-1 (intercelulární adhezní molekula) na endotelové buňky cév. *Patrolling* je také zčásti závislý na molekule CD11b. Pokud dojde k nějakému patologickému stavu, tak buňky endotelu (nebo jiné imunitní buňky přitahující tyto monocyty) začnou uvolňovat

chemotaktické faktory. Mezi tyto chemoatraktanty patří např. CX3CL1 (tzv. fraktalkin), agonisté TLR7 (Toll-like receptor), CCL5 (ligand chemokinů s C-C motivem, tzv. RANTES) a SIP (sfingosin 1 fosfát), na které monocyty mohou reagovat prostřednictvím vlastní exprese příbuzných receptorů (Thomas et al. 2015).

c) Přejídné monocyty ($CD14^{++}CD16^{+}$)

Třetí skupinou jsou tzv. přejídné (intermediární) monocyty, které mají prozánětlivou funkci a na jejichž povrchu jsou přítomny molekuly CD14 i CD16 (Sekerková, 2014). Tato buněčná populace se vyskytuje především u starších pacientů a u pacientů s chronickým zánětlivým onemocněním. Na *in vitro* modelu bylo zkoumáno stárnutí buněk, schopnost buněk prezentovat antigen, schopnost interakce s buňkami endotelu i exprese intracelulárních cytokinů. Přejídné monocyty vykazovaly fenotyp aktivovaných buněk a exprimovaly povrchový znak CD209. Tato populace buněk má také vyšší expresi chemokinových receptorů a zvýšenou adhezi k endotelovým buňkám. Zvýšený výskyt přejídných monocytů může signalizovat rozvíjející se chronický zánět nebo aterosklerózu (Merino et al. 2011).



Obrázek 2 – Subpopulace monocytů na základě povrchové exprese znaků CD14 a CD16 (Upraveno dle: Ziegler-Heitbrock 2015)

2.1.4 Funkce makrofágů

Hlavní funkcí makrofágů je fagocytovat odumírající nebo poškozené buňky organismu, mikroby nebo cizorodé částice. Fagocyt se zachytí na povrch endotelu pomocí adhezivních molekul a diapedézou prostoupí do tkáně. Do místa zánětu se

pohybuje na základě chemotaktického gradientu. Pomocí rozpoznávacích mechanismů fagocyt interaguje s cizorodou částicí a pohltní ji svými pseudopodiemi (Chapel et al. 2018). Uvnitř fagocytu tedy vznikne nová vakuola, tzv. fagozom. Nastává fúze fagozomu s lyzozomem (obsahujícím hydrolytické enzymy a baktericidní látky) za vzniku fagolyzozomu. Následně dochází k oxidativnímu vzplanutí, tj. aktivaci NADPH oxidázy (tj. redukováná forma koenzymu nikotinamidadenindinukleotidfosfátu) a k likvidaci pohlčeného objektu proteolytickými enzymy (Parham a Janeway 2015).

Makrofágy fungují jako antigen-prezentující buňky (APC), které na svém povrchu vystavují fragmenty antigenů fagocytovaných částic exprimované pomocí MHC molekul II. třídy (molekuly hlavního histokompatibilního komplexu), čímž aktivují T-lymfocyty. Tato funkce propojuje přirozenou a adaptivní imunitu (Hořejší et al. 2017).

Aktivované makrofágy vylučují některé důležité cytokiny, které ovlivňují endoteliální buňky nebo působí na leukocyty a zprostředkovávají jejich migraci do místa poškození. Produkci cytokinů makrofágy napomáhají růstu nových cév (angiogenezi) a syntéze extracelulární matrix bohaté na kolagen (Owen et al. 2013).

2.1.5 Receptory makrofágů

Aby makrofágy správně vykonávaly své funkce, musí být nejprve aktivovány. Poté jsou schopny rozpoznávat různé cizorodé částice nebo molekuly produkované vlastním organismem reagujícím na probíhající zánět. Makrofágy rozpoznávají tyto antigenní částice pomocí různých typů svých intracelulárních nebo extracelulárních receptorů (viz obr. 3) (Abbas et al. 2017).

○ TLR

Mezi receptory makrofágů patří také TLR, které byly poprvé popsány u octomilky a hrají významnou roli v přirozené imunitě. Některé z těchto receptorů se vyskytují na buněčném povrchu, jiné (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) jsou lokalizovány intracelulárně (Hořejší et al. 2017). Pomocí těchto PRR jsou makrofágy schopny přímo rozpoznávat různé patogenní struktury (např. LPS) pomocí TLR4) (Taylor et al. 2005).

○ Komplementové receptory

Další skupina receptorů rozpoznává hlavně C3b fragment komplementu. U makrofágů se uplatňuje zejména komplementový receptor Mac-1 (CD11b/CD18),

který patří do skupiny β 2-integrinů. Pomocí komplementových receptorů se rozpoznávají opsonizované antigeny, které jsou následně fagocytovány. Jako opsoniny slouží kromě komplementových částic také protilátky, zejména izotypu IgG (Delves et al. 2017).

○ **Receptory selektinů a integrinů**

Selektinové a integrinové receptory mají význam zejména v iniciační fázi fagocytózy, kdy se musí fagocyt dostat k ložisku poškození či infekce. Makrofágy díky těmto receptorům adherují k endotelu cév a prostupují do tkáně. Integrinové receptory váží proteiny v membráně extracelulární matrix a napomáhají makrofágům doputovat do místa zánětu (Levinson 2014).

○ **Receptory pro vazbu cytokinů**

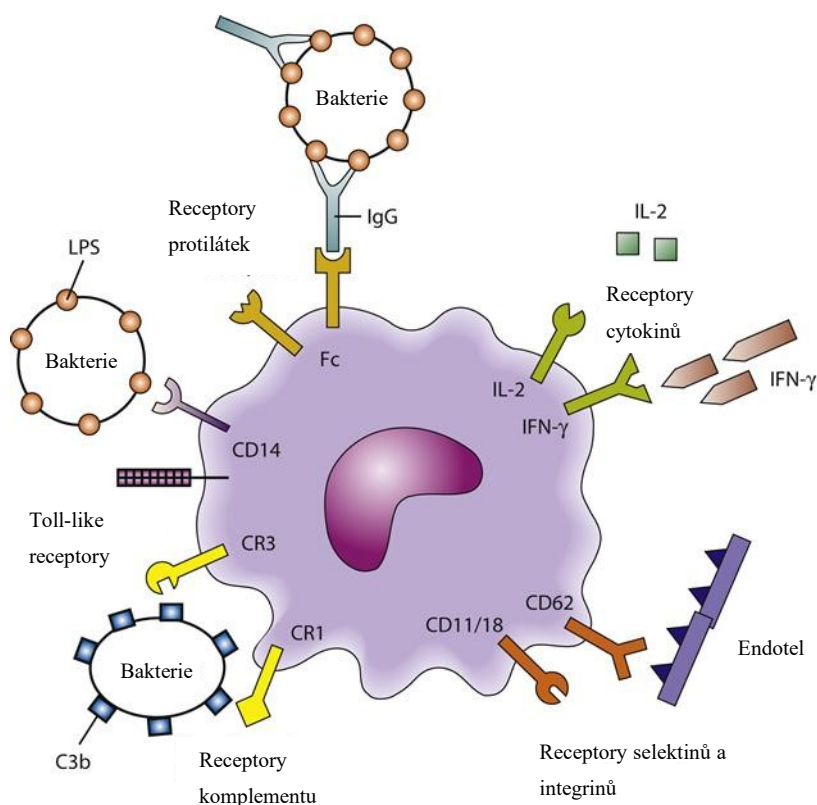
V průběhu imunitní odpovědi jsou makrofágy aktivovány působením cytokinů, které interagují s příslušnými povrchovými receptory (Biswas a Mantovani 2014).

○ **Fc receptory**

Fc receptory mají svůj název proto, že tvoří vazbu s Fc částmi imunoglobulinů. Rozlišují se různé typy těchto receptorů. Receptory, které rozpoznávají Fc část IgG, jsou rozděleny do tří skupin, které jsou označeny jako Fc γ RI, II a III (také známé jako CD64, CD32 a CD16). U lidí je každá skupina receptorů kódována 2 - 3 úzce příbuznými geny. Fc γ RI váže IgG s vysokou afinitou během časně imunitní odpovědi. Fc γ RII a III jsou receptory, které s nízkou afinitou rozpoznávají IgG ve formě opsoninů obklopujících multivalentní antigeny, během pozdní imunitní odpovědi. Různé typy Fc receptorů mohou mít různé funkce (jak aktivační, tak inhibiční) (Owen et al. 2013).

○ **Další receptory**

Jinými receptory, které se vyskytují u monocytů/makrofágů jsou NOD-like receptory, které tvoří vazbu zejména s fragmenty peptidoglykanů, RIG-like receptory rozeznávající virové RNA molekuly, dále tzv. *scavenger* receptory, které vážou negativně nabitě fosfolipidy apoptotických buněk nebo také významná skupina povrchových lektinových receptorů, které rozeznávají např. glukany, D-mannosu nebo galaktosu (Hořejší et al. 2017).



Obrázek 3 – Povrchové receptory makrofágů (Upraveno dle: Banasik 2016)

2.1.6 Subpopulace makrofágů

Makrofágy tvoří fenotypově heterogenní subpopulace (viz obr. 4). Na vzniku funkčně i metabolicky odlišných fenotypů makrofágů se podílí podmínky vnitřního prostředí (změny fagocytární kapacity, změny v produkci reaktivních druhů kyslíku (ROS), cytokinů) i migrační a adhezní vlastnosti makrofágů. Populace makrofágů se liší také genovou expresí a efektorovými funkcemi spojenými s TLR (Owen et al. 2013).

a) M1 makrofágy

Klasickou cestou aktivace makrofágů vzniká M1 subpopulace. Po vazbě antigenu na receptory Th1 buněk (T-pomocné lymfocyty), začnou tyto buňky exprimovat povrchový znak CD40L a vylučovat IFN- γ . CD40L (ligand) na Th1 buňce se naváže na CD40 (receptor) na povrchu makrofágu s pohlčenou bakterií. Současně dochází k vazbě IFN- γ na cytokinový receptor na povrchu makrofágu. Těmito signály jsou aktivovány příslušné transkripční faktory. Vazbou molekul CD40L-CD40 je aktivován nukleární faktor κ B (NF- κ B) a aktivační protein 1 (AP-1). Působením IFN- γ je aktivován transkripční faktor STAT-1 (STAT = *signal transducer and activator of transcription*). Společným působením těchto faktorů je stimulována exprese enzymů ve fagolysozomech makrofágů (Murray et al. 2014).

K degradaci fagocytovaných mikrobů dochází především působením lyzozomálních enzymů, oxidu dusnatého (NO) a ROS. Klasicky aktivované makrofágy se zapojují do prozánětlivých reakcí produkcí vlastních cytokinů (tumor-nekrotizujícího faktoru (TNF), IL-1 β , IL-12) a chemokinů, jejichž působením získávají další leukocyty do místa infekce. Ve vyšší míře také exprimují kostimulační a MHC molekuly, čímž zvyšují T-buněčnou odpověď (Abbas et al. 2017).

K negativním dopadům těchto dějů může dojít při působení fagolyzozomálních toxinů extracelulárně na normální nepoškozenou tkáň nebo při genetických mutacích v CD40 molekulách (Martinez a Gordon 2014).

b) M2 makrofágy

M2 subpopulace makrofágů vzniká alternativní cestou aktivace v reakci na cytokiny produkované Th2 buňkami (zejména IL-4 a IL-13). Takto aktivované makrofágy se podílejí na ukončení zánětu a na reparačních dějích v organismu. M2 makrofágy vylučují růstové faktory, které podporují syntézu kolagenu, tvorbu fibroblastů a angiogenezi. Alternativně aktivované makrofágy produkují cytokiny IL-10 a TGF- β a mají protizánětlivý účinek (Gordon a Martinez 2010).

Podle funkce makrofágů a způsobu jejich aktivace lze M2 makrofágy dělit na TAM, regulační makrofágy (Mreg) a makrofágy zapojené v procesu hojení (Mosser a Edwards 2008).

o Makrofágy asociované s tumorem, TAM

Monocyty periferní krve se diferencují na makrofágy působením různých chemokinů a růstových faktorů, které jsou produkované stromálními a nádorovými buňkami v mikroprostředí nádorů. Nedávno bylo popsáno, že přítomnost prozánětlivých cytokinů IL-23 a IL-17 produkovaných tímto typem makrofágů je úzce spojena s progresí rakoviny. Zánětlivý stav koreluje s výskytem rakoviny. Makrofágy asociované s tumorem tedy přispívají k progresi onemocnění. Podporují proliferaci a vznik metastáz nádorových buněk, stejně jako angiogenezi. TAM inhibují protinádorovou imunitní odpověď, která je zprostředkována T-lymfocyty. Předpokládá se, že TAM by mohly být v budoucnu důležité v diagnostice a prognóze rakoviny, stejně jako by se mohly stát terapeutickým cílem v léčbě nádorových onemocnění (Yang a Zhang 2017).

○ Regulační makrofágy, Mreg

Populace regulačních makrofágů byla poprvé popsána po navázání komplexů tvořených IgG s antigeny patogenu (vazba Fc gamma receptoru I (FcγRI) s např. LPS) na TLR imunitní buňky *in vitro* (Gerber a Mosser 2001). Regulační makrofágy tlumí imunitní odpověď organismu a omezují imunopatologické procesy. Produkují vysokou hladinu protizánětlivého IL-10 a snižují produkci IL-12. Mreg jsou schopné prezentace antigenu, protože exprimují vysoké hladiny kostimulačních molekul (CD86) a MHC molekul II. třídy. K identifikaci této populace mohou sloužit 2 markery, a to sphingosin kináza-1 (SPHK1) a ligand patřící do superrodiny TNF14 (LIGHT, také znám jako TNFSF14) (Edwards et al. 2006). Nedávno bylo zkoumáno chování Mreg buněk po podání imunosupresivní léčby příjemcům transplantovaných orgánů. V této studii byl popsán jako marker pro tuto populaci makrofágů také protein-kódující gen dehydrogenasy/reduktázy 9 (DHRS9) (Riquelme et al. 2017).

○ Makrofágy zapojené v procesu hojení

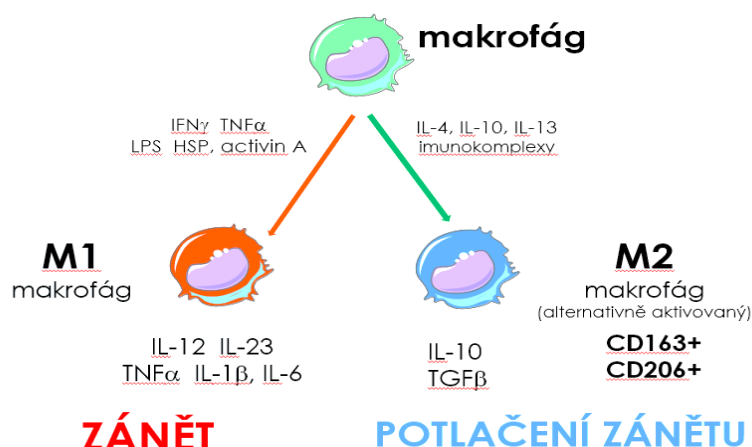
Na přelomu 70. a 80. let bylo prokázáno, že se makrofágy účastní procesů hojení tkáně a její remodelaci. Jako modelové organismy byly dříve používány myši zbavené makrofágů (mimo jiné) pomocí glukokortikoidů (Leibovich a Ross 1975). Glukokortikoidy mají ale široké spektrum účinků, takže bránily specifické prezentaci výsledků. Nyní se používají geneticky modifikované myši, u kterých se prokázala zvýšená angiogeneze, tvorba granulační tkáně, zvýšená syntéza kolagenu a růstových faktorů včetně angiogenetického růstového faktoru (VEGF) a TGF-β. Makrofágy zapojené v procesu hojení mají spíše protizánětlivé účinky, exprimují proteiny extracelulární matrix a zvyšují fibrogenezi (Lucas et al. 2010). Bylo prokázáno, že během hojení rány se vyskytují tyto makrofágy s různým fenotypem podle toho, jakého stupně opravy se účastní (Koh a DiPietro 2011).

Působením odlišných stimulů a různými signalizačními drahami bylo dosaženo *in vitro* transkripčních změn u M2 makrofágů. Na základě těchto změn byly M2 makrofágy ještě rozděleny na subtypy M2a, M2b, M2c a M2d (Röszer 2015). Monocyty jsou diferenciovány na M2a makrofágy zejména působením IL-4 a IL-13, jedná se o alternativně aktivované makrofágy. M2b makrofágy vznikají jako odpověď na působení imunokomplexů a LPS, tento typ aktivace se označuje jako typ II. Pomocí glukokortikoidů a TGF-β se monocyty diferencují na M2c makrofágy, jinak nazývané

jako tzv. deaktivované. Fenotyp M2d makrofágů vzniká působením IL-6 a adenosinů (Mantovani et al. 2004).

V diferenciaci monocytů na makrofágy se uplatňuje také faktor stimulující kolonie granulocytů a monocytů (GM-CSF) a M-CSF. Zatímco působením lidského GM-CSF dochází k polarizaci monocytů směrem k M1 fenotypu s prozánětlivou funkcí, vlivem M-CSF jsou produkovány protizánětlivé cytokiny a dochází k přechodu na M2 fenotyp (Jaguin et al. 2013).

Během onemocnění může dojít k přesmyku z jednoho fenotypu na druhý. Organismus se chrání před nepřiměřenými zánětlivými procesy přechodem z M1 fenotypu na fenotyp M2. K tomuto přesmyku dochází v prozánětlivých podmínkách. Naopak přechodem z M2 fenotypu na M1 fenotyp nastává ochrana před Th2 reakcemi (alergie, astma). Navíc dochází ke snížení baktericidních vlastností makrofágů, čímž se organismus vyrovnává se zánětem. K tomuto typu přesmyku jsou zapotřebí protizánětlivé faktory (Curi et al. 2017).



Obrázek 4 - Subpopulace makrofágů (Upraveno dle: Stříž et al. 2014)

Nedávno byla popsána třetí skupina makrofágů, kterou lze označit jako M3 subpopulaci. Tento přechodný M3 fenotyp sestává z fenotypu M1/2, kde dochází k produkci M2 mediátorů jako odpověď na prozánětlivý reprogramovací faktor 1 (RF-M1). Druhou podskupinu představuje fenotyp M2/1, který produkuje M1 mediátory jako odpověď na protizánětlivý reprogramovací faktor 2 (RF-M2). Fenotyp M3 makrofágů pomáhá regulovat vliv RF-M1 a RF-M2 a tím předcházet nepřiměřeným zánětlivým reakcím i významnému snížení antimikrobiálních vlastností makrofágů (Malyshev a Malyshev 2015).

2.2 Sledované cytokiny a povrchové znaky buněk

Cytokiny jsou molekuly, které hrají klíčovou roli v mnoha fyziologických stavech a významně se podílí na regulaci imunitního systému. Jsou buď v rozpustné formě nebo vázané na cytoplazmatickou membránu. Receptory cytokinů slouží pro specifickou vazbu příslušného cytokinu a spojují ho s intracelulárními signalizačními molekulami (Hořejší et al. 2017). Makrofágy (jakožto buňky přirozené imunity) produkují cytokiny, které se podílí na polarizaci naivních T-lymfocytů na funkčně významné typy Th1, Th2 nebo Th17. M2 makrofágy sekretují cytokiny, které se účastní reparačních procesů a angiogeneze (Stříž et al. 2014).

Cytokinů a povrchových znaků buněk existuje velké množství, popsány jsou zde ty, které byly sledovány v praktické části této diplomové práce, týkají se makrofágů a hrají roli u potransplantačních rejekcí.

2.2.1 Cytokiny

○ IL-4

IL-4 je produkován zejména T-lymfocyty (hlavně Th2), v menší míře potom NK buňkami, žírnými buňkami, bazofily nebo eozinofily. Strukturou (i řadou funkcí) je IL-4 podobný IL-13. Receptor IL-4 je heterodimerem, který se skládá z řetězců α a γ , přičemž řetězec α váže IL-4 a řetězec γ je společný pro několik dalších cytokinů. IL-4 je klíčovým faktorem pro vývoj Th2 subpopulace lymfocytů z naivních T buněk. Vzniklá buněčná populace je typická produkcí cytokinů IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 a IL-13 (Nelms et al. 1999). IL-4 je důležitým faktorem pro růst a vývoj B lymfocytů, čímž se podílí na rozvoji protilátkové imunity. Další funkcí IL-4 je podpora tvorby IgE, což hraje roli u alergických onemocnění (např. zvýšená produkce IL-4 podporuje rozvoj astmatu). U alergií tedy působí jako prozánětlivý cytokin, naproti tomu u autoimunitních onemocnění je cytokinem protizánětlivým. IL-4 je udáván jako hlavní indukční faktor pro M2 alternativně aktivované makrofágy (Stříž a Holář 2015).

○ TNF- α

TNF- α (nazývaný také kachexin) je cytokin, vylučovaný zejména aktivovanými makrofágy, méně pak jinými typy buněk jako jsou neutrofily, NK buňky nebo eozinofily. Tento cytokin je buď v transmembránové nebo solubilní formě. Hlavní uplatnění TNF- α nachází v regulaci imunitních buněk, kachexii, zánětu nebo apoptóze.

TNF- α indukuje v játrech proteiny akutní fáze a je schopen zvyšovat tělesnou teplotu. Při septických stavech, stimuluje okolní buňky k produkci IL-1 a IL-6 (Kriegler et al. 1988). Uplatňuje se v prozánětlivé imunitní odpovědi, jeho nadbytečné působení však může vést k autoimunitním onemocněním jako jsou idiopatické střevní záněty (IBD), revmatoidní artritida nebo některé formy astmatu. Pro léčbu těchto onemocnění se často používají monoklonální protilátky proti TNF, např. infliximab nebo adalimumab a dále solubilní receptor, etanercept. Proběhly studie, ve kterých bylo zkoumáno působení inhibitorů TNF- α v léčbě rakoviny, zatím však bez uspokojivých výsledků. Tyto inhibitory se nyní využívají převážně v léčbě chronických zánětlivých onemocnění (Clark 2007).

○ TGF- β

Jedná se o cytokin se širokou škálou funkcí produkovaný zejména fibroblasty, buňkami epitelu, trombocyty, erytrocyty, ale i různými typy leukocytů. TGF- β patří mezi protizánětlivé cytokiny a tlumí imunitní odpověď, podporuje ale proliferaci a vývoj Treg a Th17 buněk. TGF- β tvoří vazbu s komplexem serin-threonin-kináz a přenáší signál fosforylační kaskádou za pomoci SMAD proteinů (skupina strukturně podobných proteinů) do jádra, kde dochází k regulaci genové exprese (Massagué 2012). V místech poranění se uplatňuje tento cytokin jako růstový faktor tkáně a podílí se na její reparaci a regeneraci. TGF- β působí imunosupresivně v nádorové tkáni, čímž podporuje nádorové bujení. Hraje roli také v patofyziologii některých onemocnění, jako jsou Alzheimerova choroba nebo bronchiální astma (Robinson et al. 2006).

○ IL-10

Původní název tohoto cytokinu je faktor inhibující syntézu cytokinů. Jedná se o jeden z nejznámějších protizánětlivých cytokinů. Produkují ho zejména Th2 buňky, Treg a M2 makrofágy a hraje roli v regulaci a diferenciaci různých imunitních buněk. IL-10 je inhibitorem antigenní prezentace, inhibuje také expresi MHC molekul II. třídy, stejně jako tlumí kostimulační signály. Působí hlavně na makrofágy a DC a inhibuje produkci jimi uvolňovaných prozánětlivých cytokinů. Byla studována úloha rekombinantního IL-10 v protizánětlivé léčbě, nicméně se zdá, že lepší uplatnění v regulaci imunitní odpovědi má IL-10 produkovaný Treg a Th buňkami (Mosser a Zhang 2008). Při léčbě rekombinantním IL-10 docházelo k nadprodukcí prozánětlivých cytokinů, která je nejspíše způsobena kostimulační funkcí IL-10 při

aktivaci B-lymfocytů a podporou proliferace NK buněk. Testován byl IL-10 v terapii Crohnovy choroby, psoriázy nebo revmatoidní artritidy. Léčba rekombinantním IL-10 ale má úskalí zejména v překrývajících se imunopatologických a imunosupresivních vlastnostech tohoto cytokinu, přičemž je velmi těžké nastavit jeho optimální dávku (Stříž a Holář 2015).

○ IFN- γ

Tento cytokin se uplatňuje v přirozené i adaptivní imunitě svými antivirovými a antibakteriálními účinky. Produkován je především NK buňkami, aktivovanými Th lymfocyty a cytotoxickými T-lymfocyty. IFN- γ zvyšuje expresi MHC molekul I. i II. třídy a je také významným aktivátorem makrofágů (klasická cesta aktivace). Při navázání IFN- γ na receptor IFN- γ , který je přítomen téměř na všech buňkách, dochází k aktivaci signální dráhy JAK-STAT (Janus kináza – signální přenašeč a aktivátor transkripčních proteinů) (Schoenborn a Wilson 2007). Na uvolňování IFN- γ je založen tuberkulinový test. Pro klinické účely se využívá IFN- γ v léčbě granulomatózní choroby nebo osteopetrózy. Zatím není schválena léčba rakoviny pomocí IFN- γ a testuje se také jeho využití v terapii některých typů hepatitid (Razaghi et al. 2016).

○ IL-1

Jedná se o vůbec první popsany interleukin. Vyskytuje se ve dvou formách, a to jako IL-1 α (také známý jako hematopoetin 1) a IL1- β (leukocytární pyrogen), přičemž obě formy se váží na stejný receptor. IL1- α se vyskytuje spíše vázaný na membránu a funguje také jako transkripční faktor. IL1- β se nachází hlavně v solubilní formě a přispívá k regulaci imunitních procesů (Arend et al. 1998). Zvýšená hladina solubilního IL1- β hraje roli u revmatické artritidy, infekcí, Parkinsonovy choroby nebo IBD. IL-1 představuje typický prozánětlivý cytokin, který indukuje tvorbu dalších prozánětlivých cytokinů, chemokinů, proteinů akutní fáze či adhezivních molekul, ovlivňuje epiteliální buňky a fibroblasty. Klinický význam je založen zejména na léčbě pomocí IL-1Ra (také znám jako anakinra) nebo se používají některé monoklonální protilátky, které inhibují funkci tohoto cytokinu, a tím snižují zánětlivou odpověď organismu (Borthwick 2016).

○ IL-13

Cytokin IL-13 je secernován především Th2 buňkami, NKT-lymfocyty, žírnými buňkami, bazofily nebo eozinofily. Strukturně je podobný IL-4 a sdílí i některé funkční rysy tohoto interleukinu. Uplatňuje se zejména v syntéze a regulaci IgE a hraje roli u mnoha alergických stavů, např. u astmatu. Přestože se uplatňuje především v patofyziologii dýchacích onemocnění, disponuje i některými protizánětlivými vlastnostmi. IL-13 indukuje změny ve střevní mikroflóře a vytváří prostředí nepřátelské k parazitům (Minty et al. 1993).

2.2.2 CD znaky

○ CD3

Jedná se o jeden z prvních povrchových antigenů T-lymfocytů identifikovaných pomocí monoklonálních protilátek. Molekula CD3 se skládá ze čtyř polypeptidických řetězců. Nejdříve je molekula CD3 exprimována kmenovými buňkami thymocytů, které se následně diferencují a antigen CD3 přechází na povrch všech zralých T-lymfocytů, kde se váže na T-buněčný receptor (TCR). Specifičnost antigenu CD3 pro T-buňky, z něj dělá účinný imunohistochemický marker pro rozlišení buněčných typů leukémií (Kuhns et al. 2006).

○ CD14

Glykoprotein CD14 se vyskytuje jako vázaný na membránu myeloidních buněk i v solubilní formě v různých tělesných tekutinách. Jedná se o diferenciační znak monocytů a makrofágů, v mnohem menší míře je exprimován neutrofily a DC. Vazbou bakteriálního LPS na receptor CD14 dochází k indukci prozánětlivé odpovědi. Leukocyty začnou produkovat prozánětlivé cytokiny, např. TNF- α (Wright et al. 1990). Molekula CD14 na povrchu makrofágů hraje roli také v rozpoznání a fagocytóze apoptických buněk. K lepšímu navázání CD14 na LPS slouží LBP (protein-vážíci LPS), který až 100x zvyšuje buněčnou aktivaci zprostředkovanou TLR4 (Devitt et al. 1998).

○ CD16

CD16 transmembránový glykoprotein (Fc γ RIII) tvoří vazbu s Fc částí protilátky IgG. Existuje ve dvou izoformách, přičemž CD16A se vyskytuje na NK buňkách, monocitech a makrofágích, zatímco molekula CD16B je exprimována neutrofily. Po vazbě CD16 na Fc receptor IgG protilátky dochází k zahájení signalizačních dějů, které

vedou k fagocytóze, proliferaci a k reakci buněčné cytotoxicity zprostředkované protilátkami (ADCC) (Zhang et al. 2000). Zkoumá se využití molekuly CD16 jako cíle při léčbě nádorových onemocnění (Schrama et al. 2006). Pozorování exprese molekul CD14 a CD16 je využíváno při identifikaci různých buněčných populací (pro účely této práce zejména pro charakteristiku populací monocytů/makrofágů, popsanych v kapitole 2.1.3 Subpopulace monocytů).

○ **CD54**

Molekula CD54 představuje transmembránový protein, také známý jako ICAM-1. CD54 existuje v membránové i solubilní formě a je exprimována aktivovanými makrofágy, lymfocyty a endoteliálními buňkami. Ligandem pro ICAM-1 jsou β -2 integriny CD11a/CD18 (LFA-1) nebo CD11b/CD18 (tj. makrofág-antigen = Mac-1), které jsou na povrchu leukocytů. Tento vazebný proces předchází transmigraci leukocytů do místa zánětu a uplatňuje se u kostimulačních funkcí při aktivaci T-lymfocytů (Roebuck a Finnegan 1999). Dále funguje tato molekula jako receptor pro rinovirus při vstupu do respiračního epitelu. Zvýšená exprese CD54 je nalézána u mnoha patologických stavů, jako je subarachnoidální krvácení, některé typy nádorových onemocnění, ateroskleróza, revmatoidní artritida, oční alergie, malárie nebo srdeční selhání (Lawson a Wolf 2009).

○ **CD163**

CD163 je makrofágově specifický *scavenger* receptor pro zachytávání komplexu haptoglobinu-hemoglobinu. Zvýšená exprese tohoto receptoru je typicky nalézána při zánětu u M2 alternativně aktivovaných makrofágů, zatímco u klidových monocytů je přibližně 10x nižší (Thomsen et al. 2013). CD163 funguje také jako bakteriální receptor a důsledkem této vazby je produkce prozánětlivých cytokinů (Fabriek et al. 2009). Existuje také rozpustná forma tohoto receptoru (sCD163), která vzniká po enzymatickém štěpení metaloproteázy, která následně štěpí také membránovou formu TNF- α . Zvýšená koncentrace sCD163 je měřena v séru u zánětlivých onemocnění jater, diabetu 2. typu, revmatoidní artritidy nebo infekčních onemocnění, např. u HIV (*human immunodeficiency virus*) infekce. V likvoru je zvýšená koncentrace sCD163 příznakem subarachnoidálního krvácení (Etzerodt a Moestrup 2013).

○ CD206

Jedná se o manózoový receptor C-lektinového typu, který je exprimován především na makrofázích a nezralých DC. U monocytů, na buňkách Langerhansových ostrůvků a u zralých DC tato exprese nebyla prokázána. Při zánětu je CD206 přítomný na některých kožních buňkách, jako jsou fibroblasty a keratinocyty (Wollenberg et al. 2002). Pomocí tohoto receptoru jsou rozpoznávány zejména intracelulární bakterie. Účastní se fagocytózy a endocytózy a jeho vyšší exprese je nalézána u některých patologických stavů, např. u nádorového onemocnění (Azad et al. 2014).

○ CD209

C-lektinový transmembránový receptor CD209, také známý jako DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin*), je exprimovaný zejména na DC a jejich prekurzorech. Specificky rozpoznává některé patogeny podle sacharidových struktur a na základě toho, je indukována imunitní odpověď. CD209 reguluje adhezní procesy. Interaguje s molekulou ICAM-2 na buňkách endotelu nebo s ICAM-3 na T-lymfocytech. DC-SIGN se uplatňuje v iniciační fázi HIV infekce (Berg a Geijtenbeek 2013). Další funkcí adhezního receptoru DC-SIGN je rozpoznání široké škály patogenů, jejich zpracování a prezentace antigenu T-lymfocytům. Receptor CD209 může být použit jako cíl pro indukci virové a protinádorové imunity (Engering et al. 2002).

2.3 Transplantace ledvin

Transplantace je termín pro přenos tkáně nebo orgánu z místa na místo v rámci jednoho organismu nebo mezi lidmi (popř. jinými živočišnými druhy) navzájem. Transplantace v rámci jednoho organismu se označují jako autologní. Alogenními transplantacemi jsou přenosy orgánů nebo tkání mezi jedinci téhož druhu. Transplantace xenogenní označují přenos štěpu z jiného živočišného druhu na člověka. Ještě existují syngenní transplantace, představující přenos štěpu mezi geneticky téměř identickými zvířaty (např. mezi jednovaječnými dvojčaty nebo inbredními živočichy v rámci laboratorních pokusů). První úspěšná transplantace ledvin proběhla mezi monozygotními dvojčaty s velmi podobným histokompatibilním systémem antigenů (HLA) (Krejsek a Kopecký 2004).

2.3.1 Počátky transplantační imunologie

První pokusy o transplantace nebyly moc úspěšné, protože se vědělo jen velmi málo o imunitních reakcích organismu. Výzkum v oblasti alotransplantátů započal až ve 40. letech, kvůli velkému množství popálených letců během letecké bitvy o Anglii. Peter B. Medawar byl prvním vědcem, který upozornil na důležitost imunitního systému v transplantační medicíně. Zabýval se pokusy s kožními štěpy u králíků, zkoumal zánětlivou fázi imunitní odpovědi v organismu a existenci HLA. V roce 1960 získal Nobelovu cenu za objev aktivní tolerance. Český vědec Milan Hašek prováděl v téže době pokusy s kuřecími a kachními embryi a zjistil, že propojením krevních oběhů v organismu nevzniká protilátková odpověď proti cizím erytrocytům (Kieslichová 2015).

2.3.2 Transplantační imunologie – rejekce ledvin

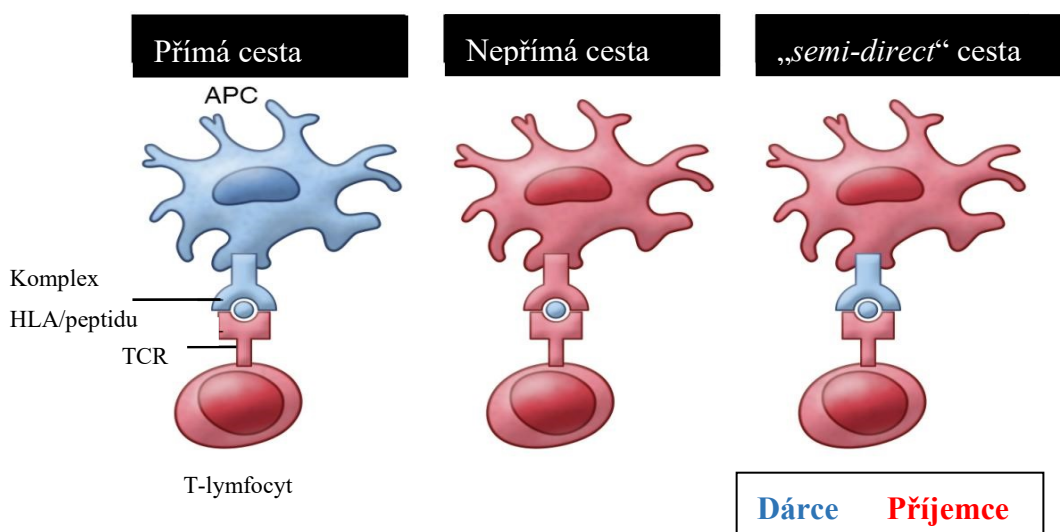
Transplantace ledvin je indikována u pacientů v terminálním stádiu renálního selhání. Nabízí pacientům lepší kvalitu života v porovnání s dialyzační léčbou. Příjemce ledviny musí být zdravotně způsobilý k transplantaci (kontraindikací může být vysoký věk, sepse, koagulopatie a další). Transplantát může pocházet buď od zdravých nebo kadaverózních dárců. Příjemce a dárce musí být kompatibilní v AB0 systému a u obou by měla být co nejlepší shoda v HLA antigenech. Navíc je prováděna křížová zkouška se sérem příjemce a lymfocyty dárce, která musí mít negativní výsledek (Tesař a Viklický 2015).

Mezi nejzávažnější potransplantační komplikace patří rejekce transplantovaného orgánu. Z patofyziologického hlediska lze rejekce dělit na hyperakutní, akutní a chronické. Z imunologického pohledu hrají nejdůležitější roli v rejekci $CD4^+$ T-lymfocyty. Aby nedošlo k odhojení transplantátu, podávají se pacientovi imunosupresiva. Imunosupresiva se dělí na indukční (např. basiliximab, antithymocytární globulin), udržovací (např. prednison, tacrolimus nebo cyklosporin, který zabraňuje $CD4^+$ lymfocytům tvořit IL-2) a protirejekční (např. basiliximab nebo alemtuzumab) (Murphy a Weaver 2017).

Existuje aferentní a eferentní fáze rejekce. V první jmenované fázi prezentují DC MHC molekuly dárce $CD4^+$ T-lymfocytům příjemce. T-lymfocyty iniciují počáteční fázi rejekce tím, že do místa transplantovaného orgánu povolávají další typy

buněk (NK buňky, CD8⁺ T-lymfocyty, B-lymfocyty), které se spolu s protilátkami a komplementem podílí na destrukci štěpu (Chapel et al. 2018).

Cizí antigeny mohou být rozpoznány buď přímou (APC dárce prezentují dárcovské MHC molekuly T-lymfocytům příjemce), nepřímou (APC příjemce prezentují peptidové fragmenty původních dárcovských MHC-T lymfocytům příjemce) nebo tzv. „*semi-direct*“ cestou, kde APC příjemce prezentují komplex HLA/peptidu dárce T-lymfocytům příjemce (Herrera et al. 2004). Schéma rozpoznávání aloantigenů T lymfocyty je zobrazeno na obr. 5.



Obrázek 5 – Různé typy rozpoznávání aloantigenů T lymfocyty (Upraveno dle: DeWolf a Sykes 2017)

Mezi nejčastější potransplantační komplikace patří infekční onemocnění. Konkrétně zejména cytomegalovirové (CMV) nebo infekce virem Epstein-Barrové (EBV), ke kterým jsou pacienti s tlumeným imunitním systémem imunosupresivou náchylnější. Další komplikací může být recidiva původního onemocnění, např. glomerulonefritidy. K nejběžnějším příčinám úmrtí pacientů po transplantaci ledvin patří také rozvoj nádorových onemocnění u příjemce nebo akutní infarkt myokardu. K úmrtí z důvodu rejekce štěpu nedochází často, protože tato komplikace je řešitelná pomocí hemodialýzy (Owen et al. 2013).

2.3.3 Mononukleární fagocyty při rejekci ledvin

Monocyty a makrofágy hrají velmi důležitou roli v imunopatologii rejekce ledvin. Podílejí se na rozpoznání aloantigenů, jeho prezentaci T-lymfocytům a kostimulaci. Patří k hlavním producentům prozánětlivých cytokinů a účastní se tkáňově reparačních procesů. V místě alotransplantátu je velké množství těchto buněk

a jejich přítomnost může mít, jak negativní vliv na transplantovaný orgán (zhoršení funkce orgánu, odhojení alotransplantátu), tak i pozitivní vliv (reparace tkáně, Mreg makrofágy). Funkce monocytů a makrofágů se nepotlačuje běžně používanými imunosupresivy (kromě kortikosteroidů), protože ty, se svým účinkem primárně nezaměřují na buňky této řady a jsou cíleny převážně na aktivitu T-lymfocytů (Bosch et al. 2017).

S transplantací ledvin jsou spojeny změny v procentuálním zastoupení buněčných subpopulací periferních monocytů. Jedná se zejména o subpopulace $CD14^+CD16^+$ a $CD14^+CD163^+$ monocytů. Hodnoty $CD14^+CD16^+$ monocytů jsou u pacientů před transplantací zvýšené (oproti zdravým lidem), zatímco během prvního týdne po transplantaci dochází k procentuálnímu úbytku této populace, zejména z důvodu selektivní delece. Návrat na fyziologické hodnoty $CD14^+CD16^+$ monocytů nastává přibližně po 2 měsících od transplantace. Procento $CD14^+CD163^+$ monocytů je zvýšeno ihned po transplantaci a ke snížení nedochází ani během prvního měsíce po zákroku. Procentuální zastoupení jednotlivých populací lze ovlivnit některými imunosupresivy, např. antithymocytárním globulinem a methylprednisolonem (Sekerková et al. 2014).

3 Cíle práce

- Na *in vitro* modelu standardizovat model diferenciac THP-1 buněk a lidských monocytů směrem k M2 fenotypu (CD163, CD206).
- Posoudit dynamiku exprese (a koexprese) antigenů CD163 a CD206 na monocytech pacientů po transplantaci ledviny.

4 Materiál a metody

4.1 Použitý materiál a přístroje

4.1.1 Modelové buňky

THP-1 buňky (ATCC TIB-202), *buffy coat* (Transfuzní oddělení Thomayerovy nemocnice).

4.1.2 Chemikálie

○ Roztoky a jiné

RPMI-1640 Medium (Sigma-Aldrich), PenStrep (Gibco), 0,05% Trypsin-EDTA (1X) (Gibco), Fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), PBS pH 7.4 (1X) (Gibco), Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare), CellWASH (BD Biosciences).

○ Monoklonální protilátky

7-AAD Viability Dye (Beckman Coulter), CD16 – Pacific Blue (3G8) (Beckman Coulter), CD14-APC-Alexa Fluor 750 (RM052) (Beckman Coulter), CD209-PerCP/Cy5.5 (9E9A8) (BioLegend), CD163-PE (GHI/61) (BioLegend), CD206-APC (15-2) (Beckman Coulter).

○ Použité stimuly

IL-4 [10 000 ng/ml] (R&D systems), TNF- α [10 000 ng/ml] (R&D systems), TGF- β [10 000 ng/ml] (R&D systems), IL-10 [25 000 ng/ml] (R&D systems).

4.1.3 Přístroje

Laminární box TOP SAFE 1.2 (BIOAIR), inkubátor CO₂ MCO 17AIC (Sanyo), světelný mikroskop Fluovert (Leitz), třepačka Vortex V-1 plus (Biosan), centrifuga Centrifuge 5810 R (Eppendorf), centrifuga MiniSpin (Eppendorf), analyzátor pro měření životnosti buněk Vi-Cell XR (Beckman Coulter), průtokový cytometr Navios (Beckman Coulter).

Data z průtokového cytometru byla hodnocena pomocí softwaru Kaluza Analysis (Beckman Coulter).

4.2 THP-1 buňky

THP-1 buňky představují buněčnou linii, která je velmi podobná linii monocytární. Tyto buňky byly získány od ročního chlapce s akutní monocytární leukémií. THP-1 buňky, včetně jejich geneticky upravených derivátů jsou užitečným modelem pro zkoumání struktury a funkce monocytů. Monocyty jsou izolovány z plné krve, zatímco THP-1 buňky jsou odvozeny od monocytů a dále kultivovány. To znamená, že u monocytů se jedná o *ex vivo* buněčný materiál, kdežto THP-1 buňky jsou pěstovány *in vitro*. Výhodou THP-1 buněk může být, že rostou v suspenzi a neadherují k povrchu kultivační nádoby (Bosshart a Heinzelmann 2016).

4.2.1 Rozmrazení THP-1 buněk

Byla připravena vodní lázeň o teplotě 37 °C a RPMI médium („Roswell Park Memorial Institute“ médium) s 20% obsahem fetálního bovinního séra (FBS) a s přidavkem antibiotik (streptomycinu a penicilinu). Ampule se zmraženými buňkami (uchovávanými v tekutém dusíku při teplotě -180 °C) byly přeneseny ve speciální polystyrenové nádobě a vloženy do vodní lázně. Po rozmrazení byly ampule lehce protřepány. Obsah ampule byl přenesen do označené zkumavky o objemu 15 ml. Následně bylo k buňkám přidáno médium do celkového objemu 10 ml. Buňky byly inkubovány ve tmě, ve stojánku po dobu 30 min při laboratorní teplotě. Během této doby došlo k postupnému vyloučení dimethylsulfoxidu (DMSO) z buněčné suspenze. Zkumavky s buňkami byly centrifugovány po dobu 10 min při 400 RCF. Po slítí supernatantu byla protřepána peleta buněk, bylo přidáno 10 ml fosfátového pufru (PBS) (pH 7,2 - 7,4) s 10% obsahem FBS a buňky byly opět centrifugovány po 10 min při 400 RCF. Takto byly buňky promyty celkem 2x. Po závěrečné centrifugaci byly buňky protřepány a suspenze byla naředěna médiem na koncentraci cca 2×10^5 buněk/ml. Buňky byly uchovávány v kultivačních lahvích v termoboxu při teplotě 37 °C s 5% CO_2 .

4.2.2 Pasážování THP-1 buněk

Pasážování THP-1 buněk bylo prováděno ve sterilních podmínkách v laminárním boxu. Roztoky RPMI a FBS byly vytemperovány na laboratorní teplotu. Buňky byly přeneseny z kultivační lahve do nových popsanych centrifugačních zkumavek o objemu 15 ml. Na přístroji Vi-Cell byla změřena životnost a koncentrace

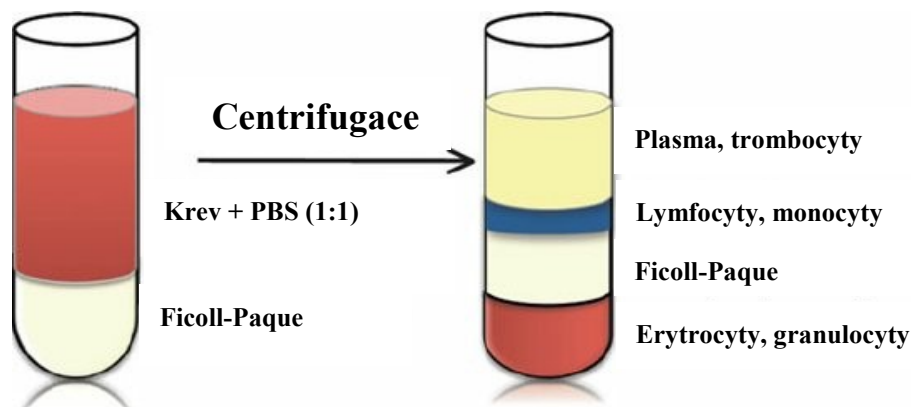
buněk v suspenzi. Buňky byly centrifugovány po dobu 5 min při 260 RCF. Supernatant byl slit a peleta byla opatrně rozklepána pomocí vortexu. K buňkám usazeným na dně zkumavky bylo přidáno čerstvě připravené médium RPMI s 10% obsahem FBS. Suspenze byla opatrně promíchána a přemístěna do nové popsané kultivační láhve, která byla umístěna do termoboxu.

4.3 Monocyty izolované z krevní složky *buffy coat*

Buffy coat představuje koncentrovanou leukocytární suspenzi s velkým podílem trombocytů. Tento podíl plné krve byl odstraněn z transfuzního přípravku (ještě s plazmou) po centrifugaci, čímž vznikl přípravek nazývaný erytrocyty bez *buffy coatu* resuspendované (EBR). Odstraněním složky *buffy coat* se předchází případným nežádoucím potransfuzním reakcím.

4.3.1 Izolace monocytů z *buffy coatu*

Buffy coat (50 ml) byl přenesen do 2 čistých centrifugačních zkumavek a naředěn pomocí PBS v poměru 1:1. Dále bylo připraveno 5 nových centrifugačních zkumavek a do každé bylo přidáno 15 ml Ficoll-Paque. Následně se velmi pomalu navrstvovalo 20 ml ředěné krve (*buffy coatu*) na hladinu Ficoll-Paque do každé zkumavky tak, aby proud naředěné krve nepronikl skrze vrstvu Ficoll-Paque a zůstal nad ní (viz obr. 6). Takto připravený materiál byl centrifugován ve zkumavkách po dobu 30 min při 520 RCF s pomalou akcelerací, bez brždění. Z každé zkumavky byl po centrifugaci přenesen prstenec lymfocytů, monocytů (na obr. 6 vpravo značen modře) do nové zkumavky. Zkumavka byla doplněna do 50 ml PBS. Dále byly tyto mononukleární buňky 4x promývány.



Obrázek 6 – Izolace monocytů, schéma vrstev před a po centrifugaci (*Upraveno dle: Bharadwaj et al. 2012*)

- **1. promytí**

Suspenze byla centrifugována po dobu 10 min při 240 RCF a při teplotě 4 °C, poté byl supernatant vylit, peleta byla resuspendována s 1 ml PBS a doplněna do 50 ml PBS.

- **2. promytí**

Suspenze byla centrifugována po dobu 10 min při 170 RCF a při teplotě 4 °C, poté byl supernatant vylit, peleta byla resuspendována s 1 ml PBS a doplněna do 50 ml PBS.

- **3. promytí**

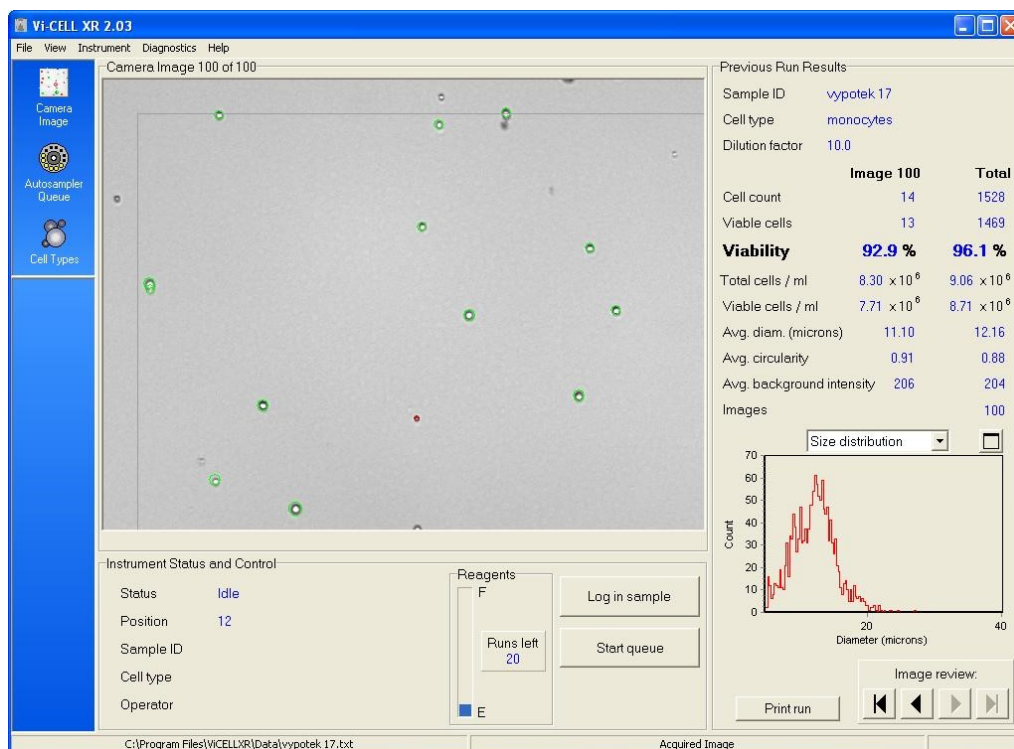
Suspenze byla centrifugována po dobu 10 min při 100 RCF a při teplotě 4 °C, poté byl supernatant vylit, peleta byla resuspendována s 1 ml PBS vychlazeného na teplotu 4 °C a doplněna do 50 ml PBS o této teplotě.

- **4. promytí**

Suspenze byla centrifugována po dobu 10 min při 100 RCF a při teplotě 4 °C, poté byl supernatant vylit, peleta byla resuspendována s 1 ml média RPMI s 10% obsahem FBS a následně bylo přidáno 9 ml tohoto roztoku. Buňky byly spočítány pomocí přístroje Vi-cell a naředěny na koncentraci vhodnou k pokusu, tj. 1×10^6 buněk/ml. Zbytek buněk byl přenesen do kultivační lahve pro adherentní buňky.

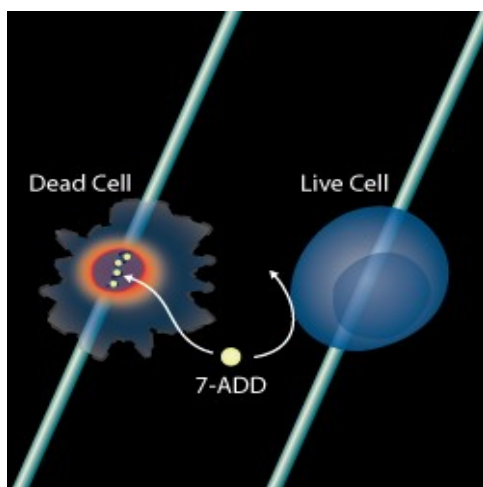
4.4 Měření životnosti buněk

Životnost buněk byla zjišťována pomocí analyzátoru Vi-Cell XR nebo metodou průtokové cytometrie. Přístroj Vi-Cell je schopen analyzovat buněčnou suspenzi v rozmezí koncentrací od 5×10^4 do 1×10^7 buněk/ml. Pomocí tohoto analyzátoru lze mimo jiné zjistit informace o velikosti buněk. Přístroj je schopen pracovat s buňkami o velikosti 2 až 70 μm , takže je schopen měřit kvasinky i buněčné shluky. Pomocí analyzátoru Vi-Cell lze zjistit počet buněk, jejich koncentraci a životnost. Měření životnosti buněk je založeno na barvení trypanovou modří, která barví cytoplazmu neživotaschopných buněk. Kamerou jsou pořizovány snímky, kde jsou živé buňky zakroužkovány zeleně a mrtvé buňky červeně, což je následně procentuálně vyhodnoceno (viz obr. 7). Ovládání analyzátoru je pomocí počítačového softwaru, kde může uživatel nastavit předchozí ředění suspenze nebo dále pracovat s výsledky.



Obrázek 7 – Ukázka práce se softwarem analyzátoru Vi-Cell

Metodou průtokové cytometrie byla zjišťována životnost buněk na principu navázání fluorochromu 7-AAD (7-aminoactinomycin D) na cytoplazmu buněk. 7-AAD se při poškození cytoplazmatické membrány neživotoschopných buněk selektivně váže na CG (cytosin-guanin) oblasti DNA (deoxyribonukleová kyselina) (viz obr. 8). Je totiž nezbytné detekovat mrtvé buňky v buněčné suspenzi a vyloučit je z analýzy, aby netvořily artefakty (nespecifickou vazbou protilátky nebo nežádoucím vychytáváním fluorochromu).



Obrázek 8 – Princip měření životnosti navázáním 7-AAD (ANON. nedatováno)

Životnost buněk byla zjišťována před každým pokusem, měření životnosti pomocí analyzátoru Vi-Cell bylo prováděno pro kontrolu, zda je vhodné pokus provést. K samotnému pokusu došlo, pokud životnost buněk přesahovala 90 % (téměř vždy). Pokud byla životnost nižší, byly zkontrolovány kultivační podmínky buněk a buňky byly pasážovány, dokud nedošlo ke zlepšení životnosti. Při měření životnosti pomocí průtokové cytometrie byla „gateovací“ strategie tvořena tak, že se hodnotily pouze živé buňky.

4.5 Diferenciace THP-1 buněk a izolovaných monocytů z krevní složky *buffy coat*

Průběžně pasážované THP-1 buňky a čerstvě izolované monocyty byly stimulovány za stejných podmínek. Použitými stimuly byly: IL-4, TNF- α , TGF- β a IL-10 (viz tab. 1). Diferencované buňky byly měřeny metodou průtokové cytometrie po 1, 3 a 6 dnech. Výsledná data byla vyhodnocena pomocí softwaru Kaluza Analysis.

THP-1 buňky byly přelity ze 2 kultivačních lahví do centrifugačních zkumavek o objemu 50 ml. Zároveň byla změřena životnost a počet buněk pomocí analyzátoru Vi-Cell (průměrná životnost buněk byla 97,8 %). Vhodná koncentrace buněk pro pokus je 1×10^6 /ml. Na základě vztahu nepřímé úměrnosti bylo vypočítáno vhodné ředění. Mezitím byl centrifugován zbytek suspenze ve dvou zkumavkách po dobu 5 min při 260 RCF.

Po vyjmutí zkumavek z centrifugy, byl supernatant vylit do biologického odpadu. Peleta byla rozklepána pomocí vortexu a naředěna na vypočítaný objem médiem RPMI bez obsahu FBS. Dále byly vhodně naředěny potřebné stimuly.

Tabulka 1 – Koncentrace použitých stimulů

	<i>Zásobní koncentrace (c_1)</i>	<i>Požadovaná koncentrace (c_2)</i>
<i>IL-4</i>	10 000 ng/ml	20 ng/ml
<i>TNF-α</i>	10 000 ng/ml	10 ng/ml
<i>TGF-β</i>	10 000 ng/ml	20 ng/ml
<i>IL-10</i>	25 000 ng/ml	20 ng/ml

Množství stimulu pipetované do jamek 6-jamkové kultivační destičky bylo vypočítáno dle vztahu: $V_1 \times c_1 = V_2 \times c_2$, který lze vyjádřit jako $V_1 = \frac{c_2 \times V_2}{c_1}$, kde:

V_1 požadovaný objem

c_1 zásobní koncentrace

V_2 objem jamky (tj. 2 ml)

c_2 požadovaná koncentrace

1) IL-4

$$V_1 = \frac{c_2 \times V_2}{c_1} = \frac{20 \text{ ng/ml} \times 2 \text{ ml}}{10\,000 \text{ ng/ml}} = 0,004 \text{ ml} = 4 \mu\text{l}$$

2) TNF- α

$$V_1 = \frac{c_2 \times V_2}{c_1} = \frac{10 \text{ ng/ml} \times 2 \text{ ml}}{10\,000 \text{ ng/ml}} = 0,002 \text{ ml} = 2 \mu\text{l}$$

3) TGF- β

$$V_1 = \frac{c_2 \times V_2}{c_1} = \frac{20 \text{ ng/ml} \times 2 \text{ ml}}{10\,000 \text{ ng/ml}} = 0,004 \text{ ml} = 4 \mu\text{l}$$

4) IL-10

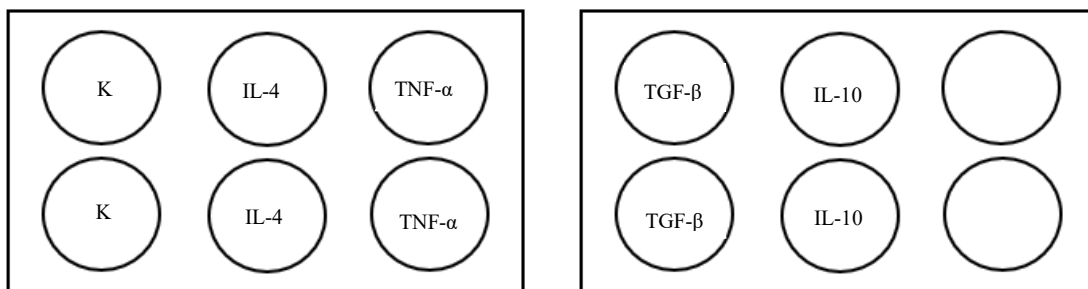
$$V_1 = \frac{c_2 \times V_2}{c_1} = \frac{20 \text{ ng/ml} \times 2 \text{ ml}}{25\,000 \text{ ng/ml}} = 0,0016 \text{ ml} = 1,6 \mu\text{l}$$

Tabulka 2 – Vypočítané množství stimulu a THP-1 buněčné suspenze

	<i>Objem jamky</i>	<i>Množství stimulu</i>	<i>Množství buněčné suspenze</i>
<i>IL-4</i>	2 000 μl	4 μl	1 996 μl
<i>TNF-α</i>	2 000 μl	2 μl	1 998 μl
<i>TGF-β</i>	2 000 μl	4 μl	1 996 μl
<i>IL-10</i>	2 000 μl	1,6 μl	1 998,4 μl

Do 6 kultivačních destiček bylo pipetováno příslušné množství stimulu a THP-1 buněčné suspenze (viz tab. 2 a obr. 9). Stimuly byly pipetovány vždy v tzv. *doubletu*, přičemž do dvou jamek byla pipetována pouze buněčná suspenze (nestimulovaná), představující kontrolu pro každé měření. Buňky byly inkubovány po dobu 1, 3 a 6 dnů

v termoboxu při teplotě 37 °C a 5% obsahu CO_2 . Následně byly měřeny metodou průtokové cytometrie (tj. 2 kultivační destičky pro 1 měření).



Obrázek 9 – Nákres inkubační fáze diferenciacce buněk v kultivačních destičkách

Stejným způsobem byly stimulovány izolované monocyty taktéž naředěné na koncentraci 1×10^6 buněk/ml. Jediným rozdílem bylo použití média RPMI s 10% obsahem FBS. Takto připravené kultivační destičky byly vloženy do termoboxu a suspenze byla inkubována při teplotě 37 °C a 5% CO_2 .

Po 24 hodinách byly vyjmuty 4 kultivační destičky (2 s THP-1 buňkami a 2 s monocyty). Obsah každé jamky byl pipetován do popsané centrifugační mikrozkuřavky s víčkem o objemu 2 ml. THP-1 buňky neadherují ke dnu jamek, takže je stačí před pipetováním lehce promíchat. 10 mikrozkuřavek s THP-1 buněčnou suspenzí a příslušnými stimuly bylo stočeno pomocí centrifugy Eppendorf MiniSpin po dobu 5 min při maximálním počtu otáček (tj. 8 000 RCF). Supernatant byl pipetován do nových popsaných mikrozkuřavek a zamražen při teplotě -20 °C. Peleta byla rozklepána pomocí vortexu a do každé mikrozkuřavky bylo přidáno 60 μ l média RPMI, suspenze byla opět promíchána. Následně byly suspenze z jednotlivých doubletů smíchány, pro větší koncentraci buněk a snadnější měření metodou průtokové cytometrie.

Monocyty se naopak aktivují, stávají se z nich makrofágy a přilnou k plastovému dnu. Proto je potřeba je nejdříve uvolnit ze dna jamek. Pro odloučení buněk byl nejdříve použit proud suspenze z pipety, poté byly buňky pipetovány a stočeny po dobu 5 min při 8 000 RCF. Supernatant byl obdobně jako u THP-1 buněčné suspenze pipetován do nových popsaných mikrozkuřavek a zamražen při teplotě -20 °C.

V jamkách zůstalo mnoho aktivovaných monocytů, které byly opláchnuty bezsérovým médiem RPMI, protože zbytky FBS mohou blokovat účinky trypsinu,

přidaného v dalším kroku. Dále bylo přidáno 1,5 ml roztoku kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) 0,05% obsahem trypsinu. Proces odloučení monocytů ode dna jamek byl sledován pomocí světelného mikroskopu. Po přibližně 10 min bylo přidáno 200 μ l FBS, aby účinek nebyl protrahovaný a nepoškodil membránové antigeny. Obsah jamek byl pipetován do mikrozkušavek a centrifugován při 8 000 RCF. Poté byl supernatant slit, buňky byly rozklepány pomocí vortexu, doplněny médiem RPMI s 10% obsahem FBS do objemu 2 ml a znovu centrifugovány při 8 000 RCF. Supernatant byl slit a do každé mikrozkušavky s peletou monocytů bylo přidáno 30 μ l média RPMI s 10% obsahem FBS (od každého stimulu nyní byly 4 mikrozkušavky s monocytární suspenzí). Monocytární suspenze ze 4 mikrozkušavek stimulovaných jedním stimulem (popř. nestimulované – tj. kontrola) byla spojena, aby bylo dosaženo vyšší koncentrace buněk (obdobně jako u THP-1 buněk).

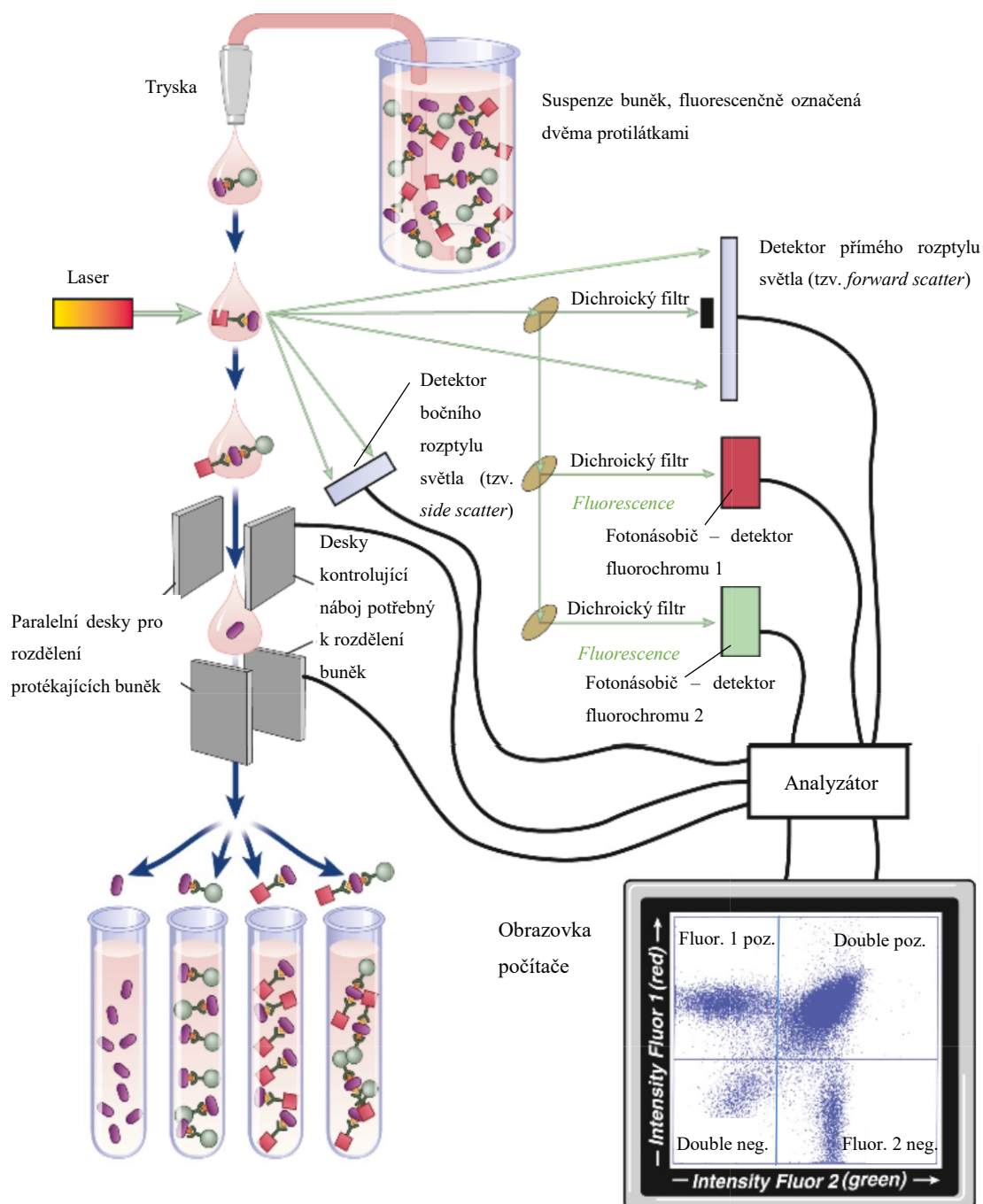
4.6 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je analytickou metodou, která zjišťuje fyzikální a chemické vlastnosti buněk v suspenzi, během jejich průchodu laserovým paprskem. Tuto metodu vyvinuli manželé Herzenbergovi spolu se svými kolegy. Společně se věnovali zejména analýze lymfocytárních subpopulací. Samotný analyzátor se skládá ze systému fluidního, optického a elektronického. Průtokový cytometr přizpůsobený pro třídění buněčných populací na základě fluorescence a rozptylu světla se označuje jako Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) (Owen et al. 2013).

Buněčná suspenze je inkubována s označenými monoklonálními protilátkami. Aspirované buňky pomocí laminárního proudění „protékají“ tryskou a procházejí laserovým paprskem. Dochází k lomu a rozptylu vyzařovaného světla excitovaným fluorochromem. Pro přímý rozptyl světla slouží tzv. *forward scatter* (FSC). Pomocí FSC, který je charakterizován lomem světla v malém úhlu, lze buňky dělit dle velikosti. Pro boční rozptyl světla slouží tzv. *side scatter* (SSC). SSC je charakterizován lomem světla v úhlu 90° a slouží k dělení buněk na základě jejich granularity (Chapel et al. 2018).

Vyzařované světlo je detekováno pomocí paralelních desek, na kterých je kontrolován náboj nesený buňkami a tyto buňky jsou náležitě separovány. Znázorněná separace na jednotlivé buněčné populace je počítačově analyzována a zobrazena na

monitoru. V tomto případě (viz obr. 10) je separace založena na dvou antigenních znacích (dvoubarevné třídění) (Abbas et al. 2017).



Obrázek 10 – Schéma FACS (Upraveno dle: Abbas et al. 2017)

4.6.1 Značení buněk pro průtokovou cytometrii

Bylo připraveno a popsáno 10 zkumavek vhodných pro průtokovou cytometrii. 5 zkumavek pro stimulované THP-1 buňky a 5 zkumavek pro stimulované izolované monocyty (viz kapitola 4.5). Pro každý stimul (i pro kontrolu – tj. nestimulované buňky) sloužila 1 zkumavka.

Do každé zkumavky bylo přidáno:

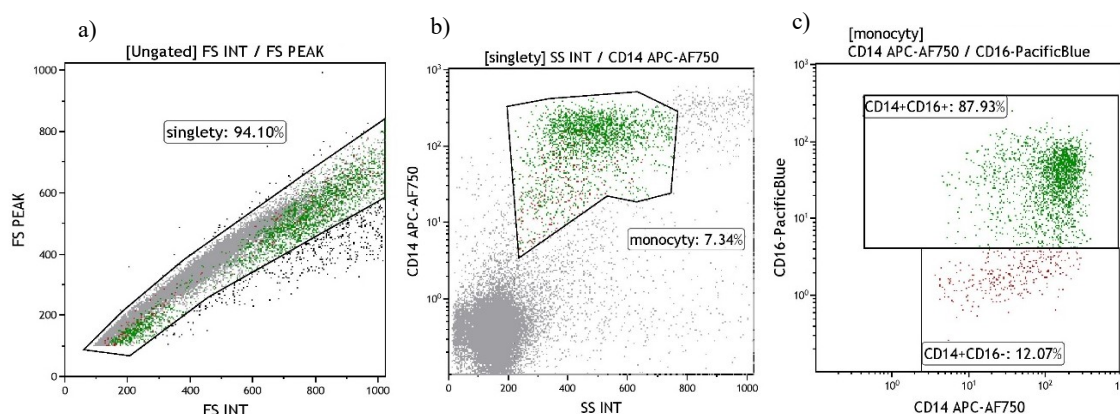
- 10 μ l CD14-APC (allophycocyanin)
- 10 μ l CD16PB (Pacific blue)
- 5 μ l CD163RM3/1-FITC
- 5 μ l CD206-APC
- 5 μ l CD209-PerCP/Cy5.5

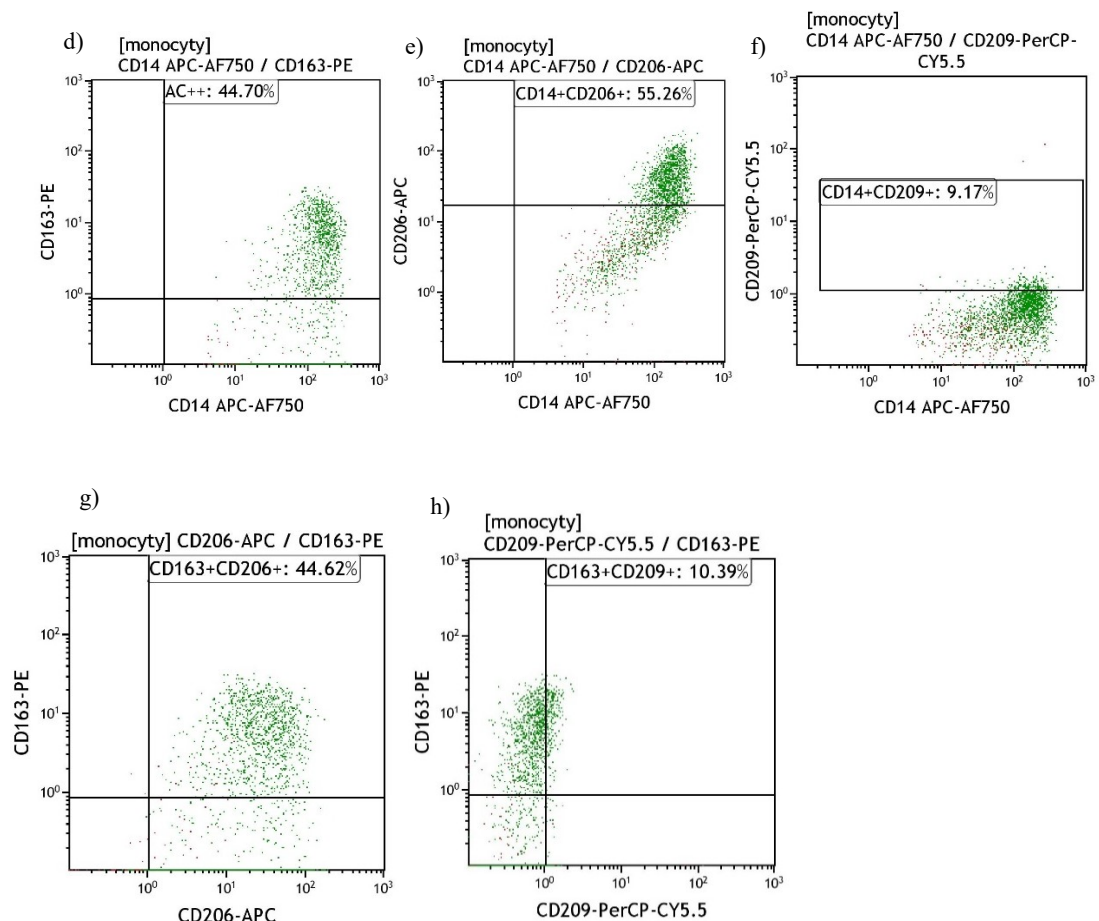
Do 5 zkumavek pro značení monocytární suspenze bylo navíc přidáno: 10 μ l 7-AAD.

Nakonec bylo do každé zkumavky pipetováno 50 μ l konkrétní buněčné suspenze (5x THP-1, 5x monocytární). Buněčné suspenze ve zkumavkách byly promíchány pomocí vortexu a inkubovány po dobu 20 min ve tmě. Poté byla reakce „zastavena“ přidáním 0,5 ml tzv. stop roztoku (CellWASH – optimalizovaný PBS roztok) a suspenze byla následně promíchána pomocí vortexu. Monocytární suspenze byly před tímto krokem promyty přidáním 1 ml stop roztoku, centrifugovány, supernatant byl slit a bylo přidáno 0,5 ml tohoto roztoku.

4.6.2 „Gateovací“ strategie pro monocyty izolované z krevní složky buffy coat

Gate (viz obr. 11a) byl vytvořen tak, aby zahrnoval pouze jednotlivé buňky (tzv. singlety) a aby došlo k vyloučení buněčných shluků nebo dvojic buněk (tzv. doubletů) z analýzy. „Gateovací“ strategie pro monocyty je založena zejména na značení protilátkou proti molekule CD14. Procentuální zastoupení monocytární populace tedy vychází z poměru zastoupení pozitivních buněk pro znak CD14 oproti průměrné hodnotě intenzity fluorescence (MFI) (viz obr. 11a-h).

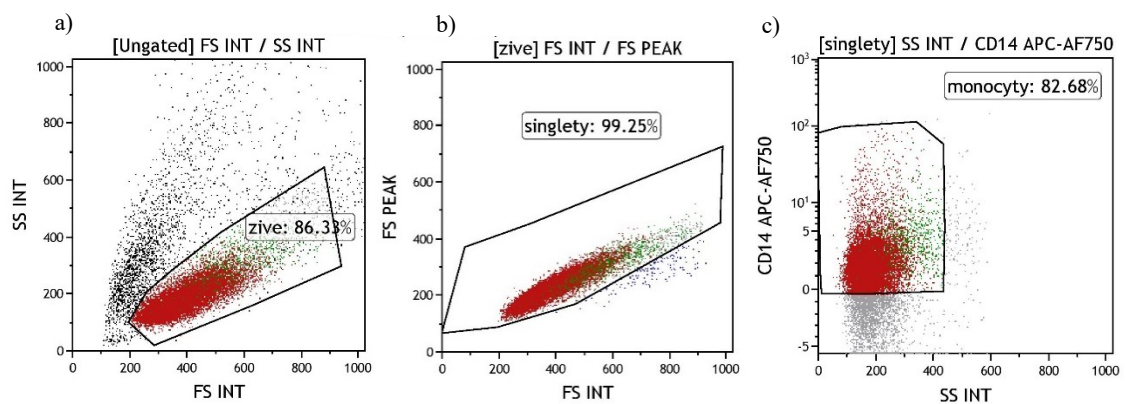


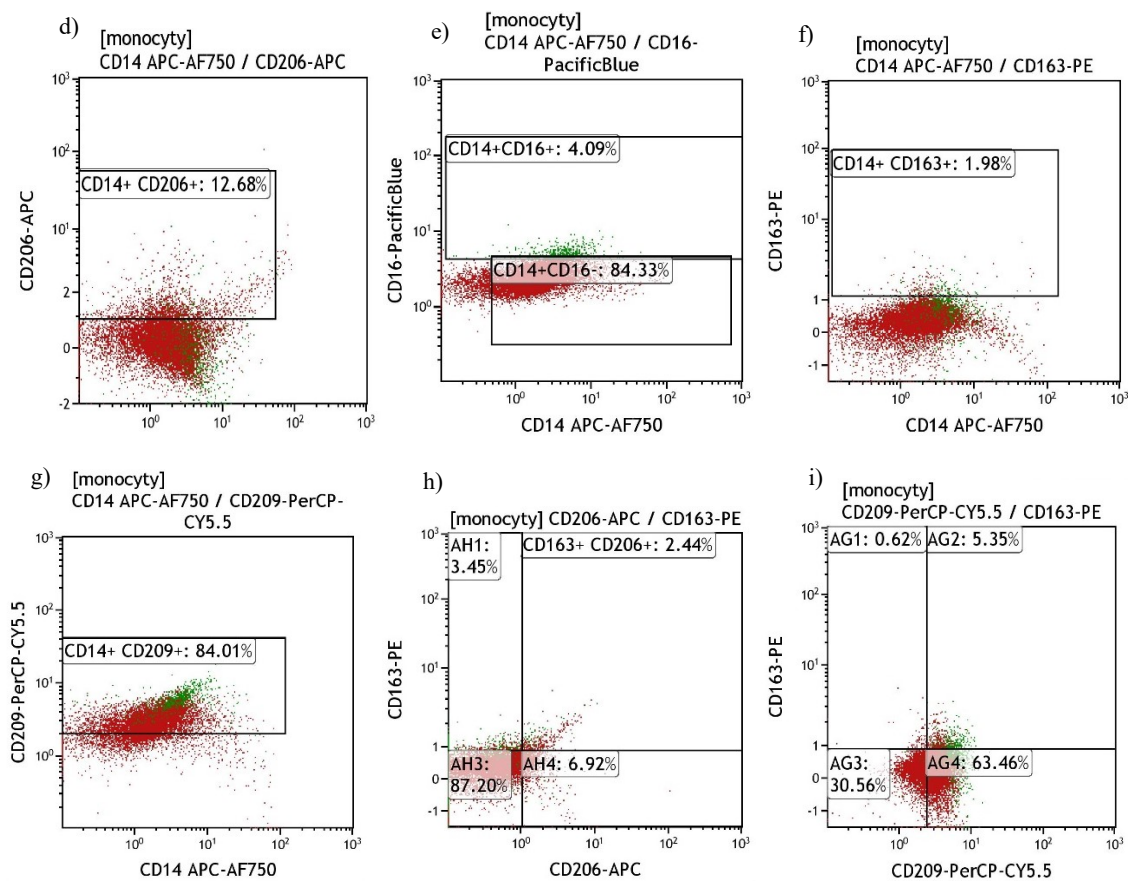


Obrázek 11 (a-h) – „Gateovací“ strategie pro monocyty izolované z krevní složky *buffy coat*

4.6.3 „Gateovací“ strategie pro THP-1 buňky

„Gateovací“ strategie pro THP-1 buňky (viz obr. 12a-i) je založena na podobném principu jako u izolovaných monocytů, u obr. 12a je *gate* zaměřen na populaci majoritních buněk.





Obrázek 12 (a-i) – „Gateovací“ strategie pro THP-1 buňky

5 Výsledky

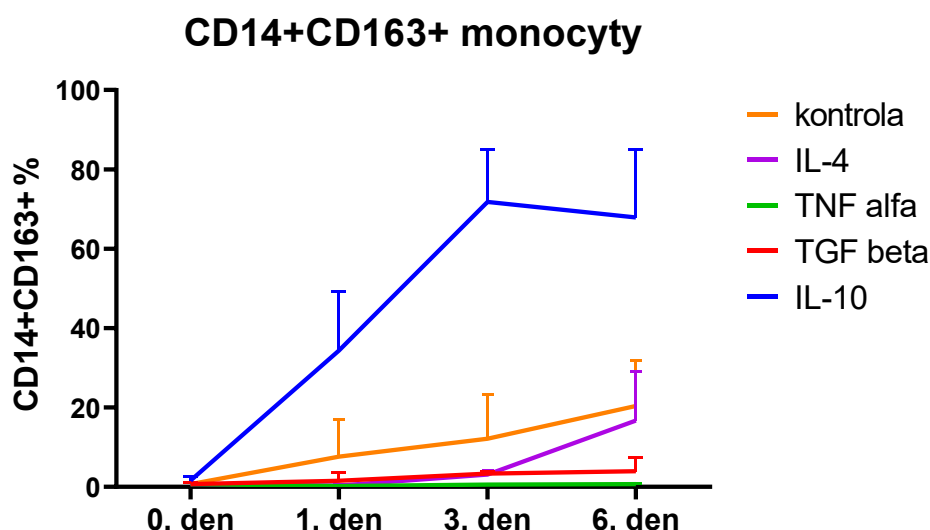
5.1 Životnost stimulovaných monocytů sledovaná pomocí průtokové cytometrie navázáním 7-AAD

Princip měření životnosti značením neživotaschopných buněk pomocí 7-AAD je uveden v kapitole 4.4 Měření životnosti buněk. Průměrná životnost monocytů klesala u všech použitých stimulů i u nestimulovaných buněk, zejména 6. den po stimulaci.

5.2 Povrchová exprese sledovaných znaků na stimulovaných monocytech izolovaných z *buffy coatu*

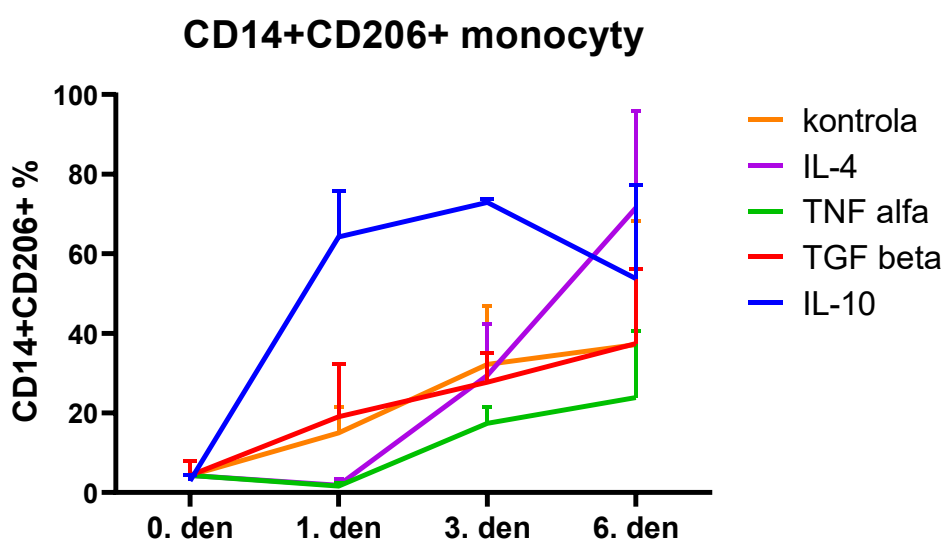
Monocyty byly stimulované IL-4 [20 ng/ml], TNF- α [10 ng/ml], TGF- β [20 ng/ml], a IL-10 [20 ng/ml] a byla měřená povrchová exprese znaků CD163, CD206 a CD209 metodou průtokové cytometrie (0.), 1., 3. a 6. den po stimulaci.

Na monocytech izolovaných z *buffy coatu* došlo k nejvyšší expresi molekuly CD163 při stimulaci IL-10 (viz graf 1). Exprese tohoto znaku vzrůstala až po 3. den od stimulace, kdy bylo dosaženo maximální hodnoty. 6. den po stimulaci došlo k mírnému poklesu, což může být zapříčiněno sníženou životností buněk. Ostatní použité stimuly expresi molekuly CD163 spíše tlumily.



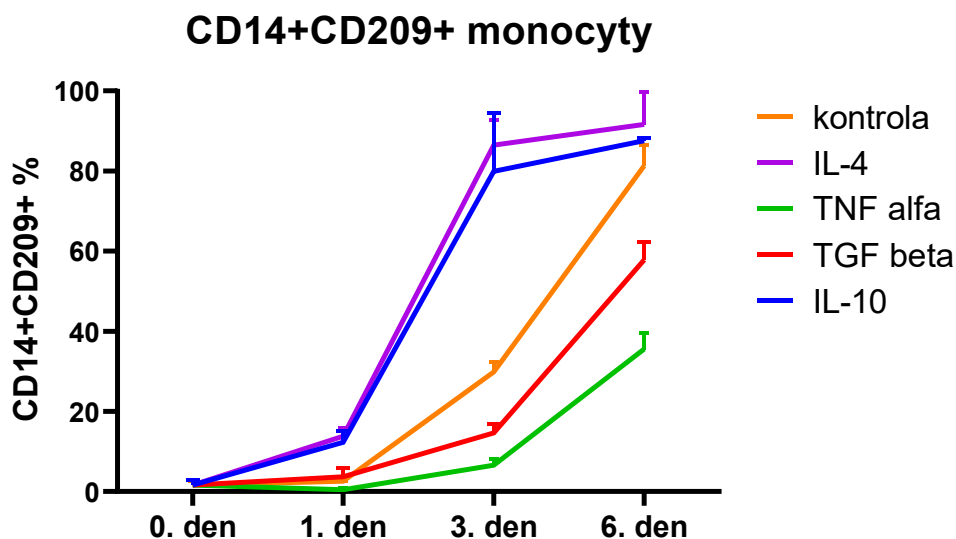
Graf 1 – Povrchová exprese molekuly CD163 (udávaná v %) na monocytech izolovaných z *buffy coatu*, které byly stimulované IL-4 [20 ng/ml], TNF- α [10 ng/ml], TGF- β [20 ng/ml], a IL-10 [20 ng/ml]. Výsledky jsou průměrem 2 měření, přičemž chybová úsečka udává směrodatnou odchylku.

Expresi znaku CD206 na izolovaných monocytech je zobrazena na grafu 2. K nejvyššímu nárůstu exprese znaku CD206 došlo 1. den po stimulaci IL-10. Hodnota se mírně zvyšovala až do třetího dne, poté došlo k mírnému poklesu. K procentuálnímu nárůstu CD206⁺ monocytů docházelo také při stimulaci IL-4 a to téměř konstantně až do 6. dne po stimulaci. Expresi molekuly CD206 byla srovnatelná u nestimulovaných monocytů a u monocytů stimulovaných pomocí TGF- β . Stimulace TNF- α měla na expresi molekuly CD206 spíše tlumivý efekt.



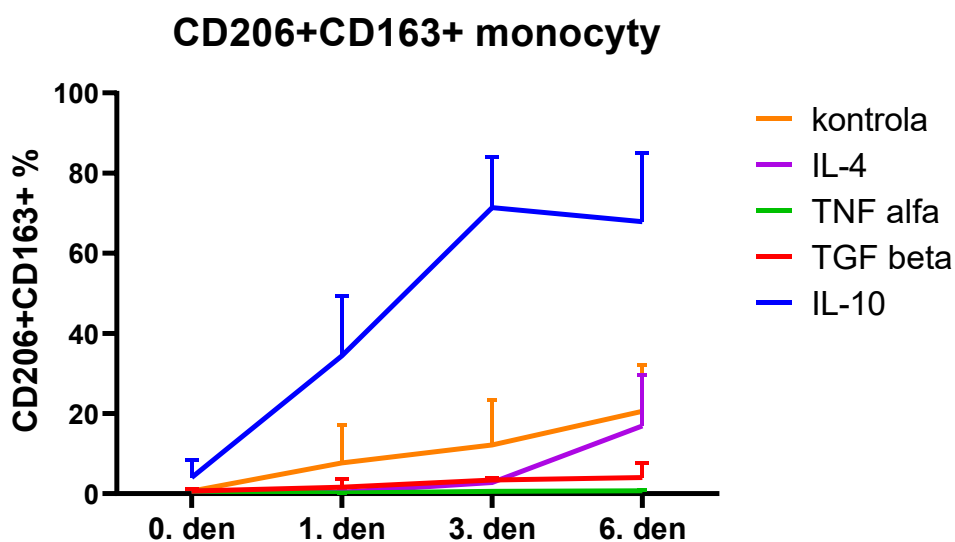
Graf 2 - Povrchová exprese molekuly CD206 (udávaná v %) na monocytech izolovaných z *buffy coatu*, které byly stimulované IL-4 [20 ng/ml], TNF- α [10 ng/ml], TGF- β [20 ng/ml], a IL-10 [20 ng/ml]. Výsledky jsou průměrem 2 měření, přičemž chybová úsečka udává směrodatnou odchylku.

Molekula CD209 byla exprimovaná nejvíce izolovanými monocyty stimulovanými pomocí IL-4 a IL-10 (viz graf 3). K největšímu nárůstu exprese tohoto znaku u těchto stimulů došlo mezi 1. a 3. dnem po stimulaci. U nestimulovaných monocytů, stejně jako při použití stimulů TNF- α a TGF- β se zvyšuje exprese molekuly CD209 nejvíce mezi 3. a 6. dnem po stimulaci.



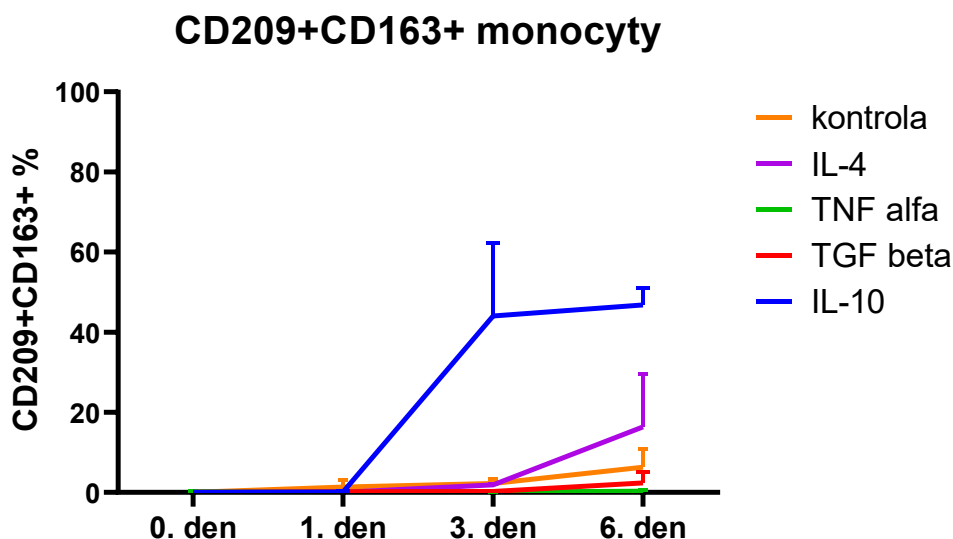
Graf 3 - Povrchová exprese molekuly CD209 (udávaná v %) na monocitech izolovaných z *buffy coatu*, které byly stimulované IL-4 [20 ng/ml], TNF- α [10 ng/ml], TGF- β [20 ng/ml], a IL-10 [20 ng/ml]. Výsledky jsou průměrem 2 měření, přičemž chybová úsečka udává směrodatnou odchylku.

Koexprese tzv. *double-pozitivních* monocytů pro znak CD206 a CD163 se oproti kontrole strmě zvyšovala až po 3. den od stimulace IL-10, poté došlo k mírnému poklesu, opět pravděpodobně zapříčiněného zhoršením životnosti buněk. Zdá se, že stimulace pomocí TNF- α a TGF- β má spíše tlumivý vliv na koexpresi těchto znaků (viz graf 4)



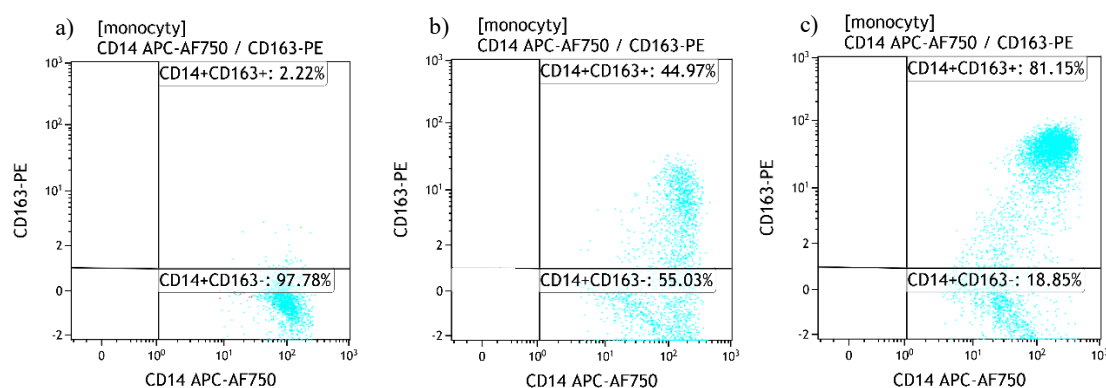
Graf 4 - Povrchová koexprese molekul CD206 a CD163 (udávaná v %) na monocitech izolovaných z *buffy coatu*, které byly stimulované IL-4 [20 ng/ml], TNF- α [10 ng/ml], TGF- β [20 ng/ml], a IL-10 [20 ng/ml]. Výsledky jsou průměrem 2 měření, přičemž chybová úsečka udává směrodatnou odchylku.

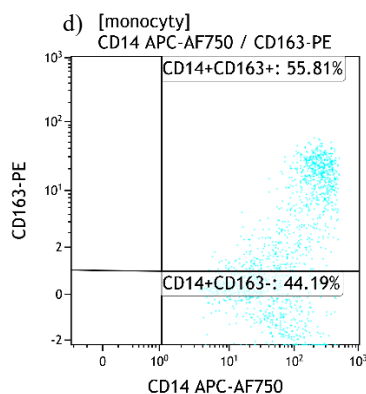
Nejvyššího nárůstu koexprese monocytů *double-pozitivních* pro znaky CD209 a CD163 bylo opět dosaženo při stimulaci IL-10 mezi 1. až 3. dnem po stimulaci (viz graf 5). Při použití IL-4 jako stimulu došlo k mírnému nárůstu koexprese mezi 3. až 6. dnem po stimulaci. TNF- α a TGF- β neměly na koexpresi těchto molekul žádný vliv.



Graf 5 - Povrchová koexprese molekul CD209 a CD163 (udávaná v %) na monocitech izolovaných z *buffy coatu*, které byly stimulované IL-4 [20 ng/ml], TNF- α [10 ng/ml], TGF- β [20 ng/ml], a IL-10 [20 ng/ml]. Výsledky jsou průměrem 2 měření, přičemž chybová úsečka udává směrodatnou odchylku.

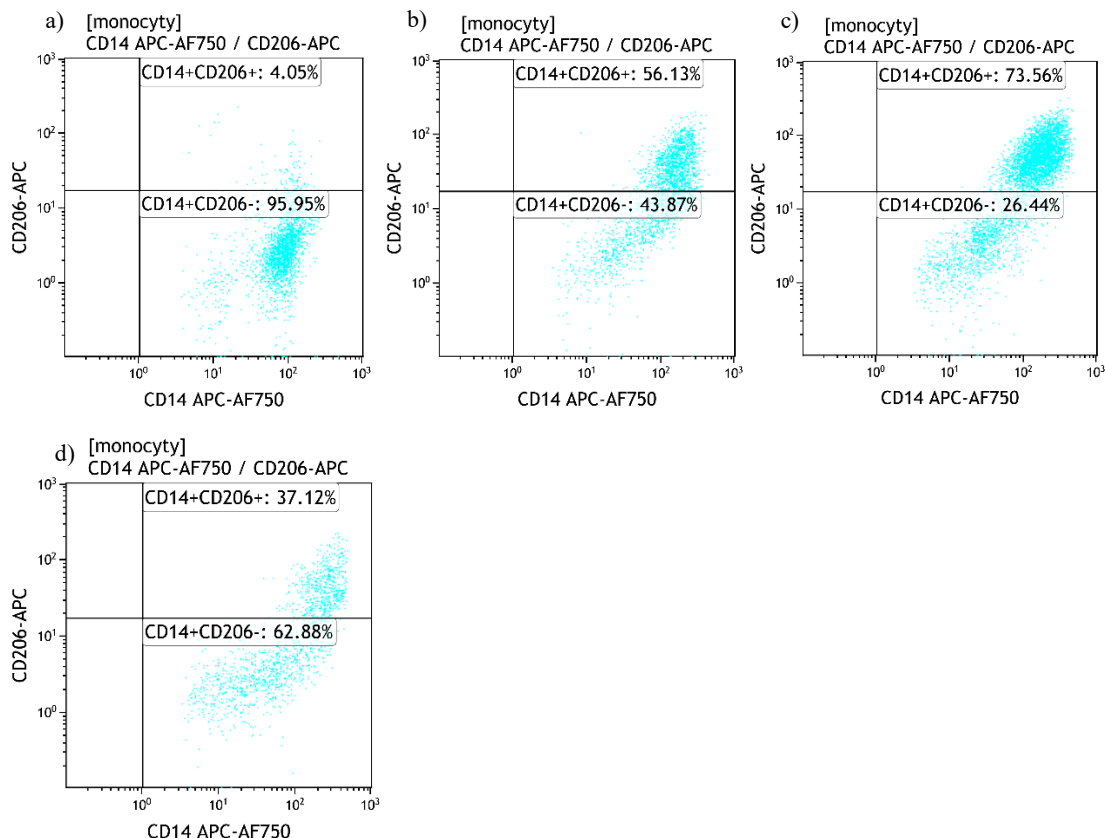
Z výše uvedených grafů je patrné, že exprese sledovaných znaků nejvíce vzrůstala při stimulaci pomocí IL-10. Na obrázku 13 (a-d) jsou uvedena data (ploty) získaná metodou průtokové cytometrie, kde je zřejmý procentuální posun populace CD14⁺CD163⁺ buněk v jednotlivých dnech (a = 0. den, b = 1. den, c = 3. den, d = 6. den) po stimulaci. Uvedené hodnoty odpovídají datům, které zobrazuje graf 1. Data jsou vyhodnocena podle „gateovacího“ protokolu (4.6.2 „Gateovací“ strategie pro monocyty izolované z krevní složky *buffy coat*) v programu *Kaluza Analysis Software* (Beckman Coulter).





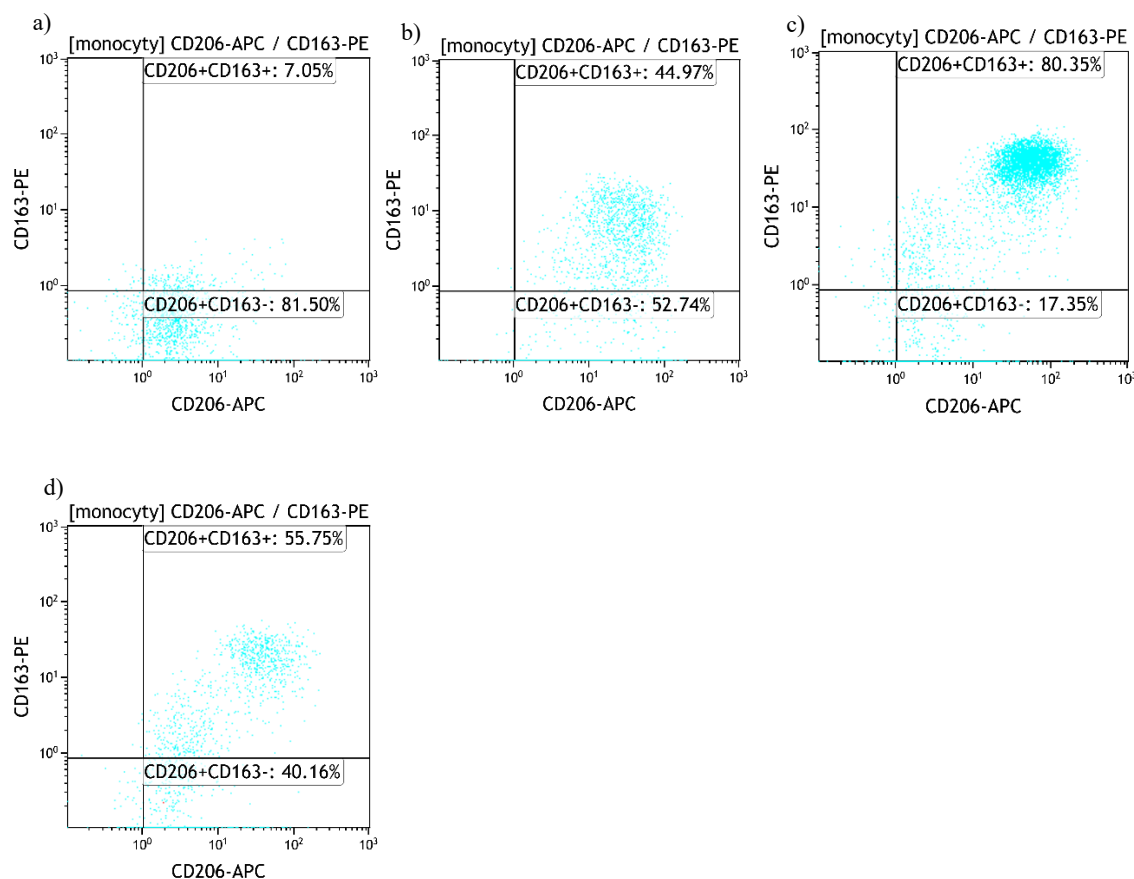
Obrázek 13 (a-d) – Data (ploty) získaná metodou průtokové cytometrie, ukazující procentuální posun populace $CD14^+CD163^+$ buněk stimulovaných IL-10 v jednotlivých dnech po stimulaci (a = 0. den, b = 1. den, c = 3. den, d = 6. den).

Na obrázku 14 (a-d) je zobrazen procentuální posun populace $CD14^+CD206^+$ buněk, stimulovaných IL-10 v jednotlivých dnech po stimulaci (a = 0. den, b = 1. den, c = 3. den, d = 6. den), naměřená data odpovídají hodnotám, které jsou zobrazeny v grafu 2.



Obrázek 14 (a-d) – Data (ploty) získaná metodou průtokové cytometrie, ukazující procentuální posun populace $CD14^+CD206^+$ buněk stimulovaných IL-10 v jednotlivých dnech po stimulaci (a = 0. den, b = 1. den, c = 3. den, d = 6. den).

Níže na obrázku 15 (a-d), je zobrazen procentuální posun *double-pozitivní* populace $CD206^+CD163^+$ buněk v jednotlivých dnech (a = 0. den, b = 1. den, c = 3. den, d = 6. den) po stimulaci IL-10. Uvedená data odpovídají hodnotám zobrazeným v grafu 4.



Obrázek 15 (a-d) – Data (ploty) získaná metodou průtokové cytometrie, ukazující procentuální posun populace $CD206^+CD163^+$ buněk stimulovaných IL-10 v jednotlivých dnech po stimulaci (a = 0. den, b = 1. den, c = 3. den, d = 6. den).

5.3 Povrchová exprese sledovaných znaků na stimulovaných THP-1 buňkách

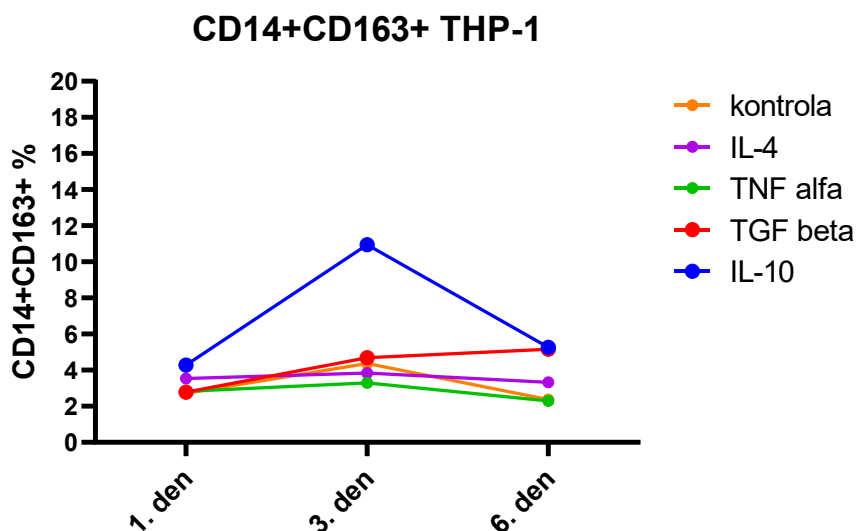
Životnost THP-1 buněk nebyla měřena pomocí 7-AAD, ale „gateovací“ strategie je zaměřena na majoritní populaci THP-1 buněk (živých, na FSC více vpravo, viz obr. 12a).

THP-1 buňky byly stimulované IL-4 [20 ng/ml], $TNF-\alpha$ [10 ng/ml], $TGF-\beta$ [20 ng/ml], a IL-10 [20 ng/ml] a byla měřena povrchová exprese znaků CD163, CD206 a CD209 metodou průtokové cytometrie (0.), 1., 3. a 6. den po stimulaci.

Stimulace THP-1 buněk byla opakována min. 3x, ovšem nikdy se nepovedlo dosáhnout porovnatelných výsledků i při dodržení stejných podmínek. Děje se tak zřejmě proto, že se jedná o nádorové buňky, které mění své vlastnosti. Níže jsou zobrazené výsledky vyhodnocené z jednoho měření, data ovšem nemají výpovědní hodnotu.

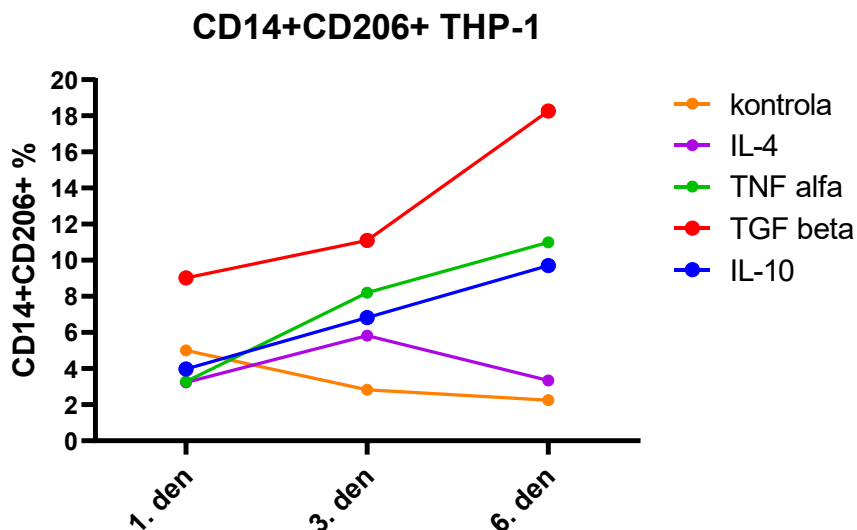
Při použití některých stimulů došlo ke zvýšení exprese sledovaných molekul, ovšem ne v takové míře, jako u stimulovaných monocytů izolovaných z *buffy coatu*. Procentuální míra exprese sledovaných znaků na THP-1 buňkách nikdy nepřekročila 20 %, proto je upravené měřítko osy Y u následujících grafů na 0-20 % (u monocytů je měřítko 0-100 %). Rozdíl je také v tom, že THP-1 buňky nebyly měřeny v den 0, protože se na rozdíl od monocytů neaktivují (neadherují ke dnu nádoby).

Graf 6 zobrazuje povrchovou expresi molekuly CD163 na stimulovaných THP-1 buňkách. Největšího nárůstu exprese této molekuly bylo dosaženo při stimulaci IL-10 3. den po stimulaci. Exprese tohoto znaku mírně narůstala také mezi 3. až 6. dnem po stimulaci pomocí TGF- β . U ostatních stimulů nedošlo k výraznějšímu posunu oproti kontrole.



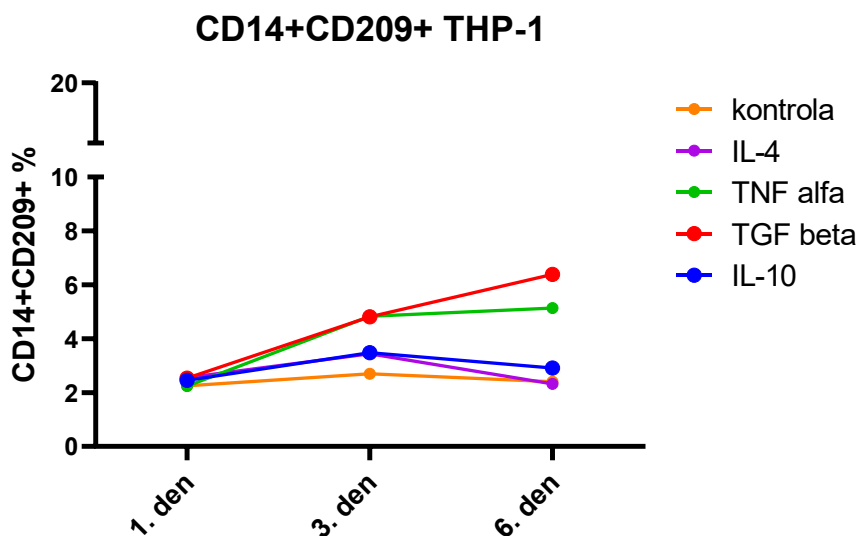
Graf 6 - Povrchová exprese molekuly CD163 (udávaná v %) na THP-1 buňkách, které byly stimulované IL-4 [20 ng/ml], TNF- α [10 ng/ml], TGF- β [20 ng/ml], a IL-10 [20 ng/ml].

Nejvyšší exprese znaku CD206 na THP-1 buňkách bylo dosaženo stimulací pomocí TGF- β , a to zejména mezi 3. a 6. dnem od stimulace (viz graf 7). Exprese mírně narůstala i při stimulaci IL-4, TNF- α a IL-10 mezi 1.-3. dnem od stimulace, při použití IL-4 došlo po 3. dnu k poklesu exprese tohoto znaku.



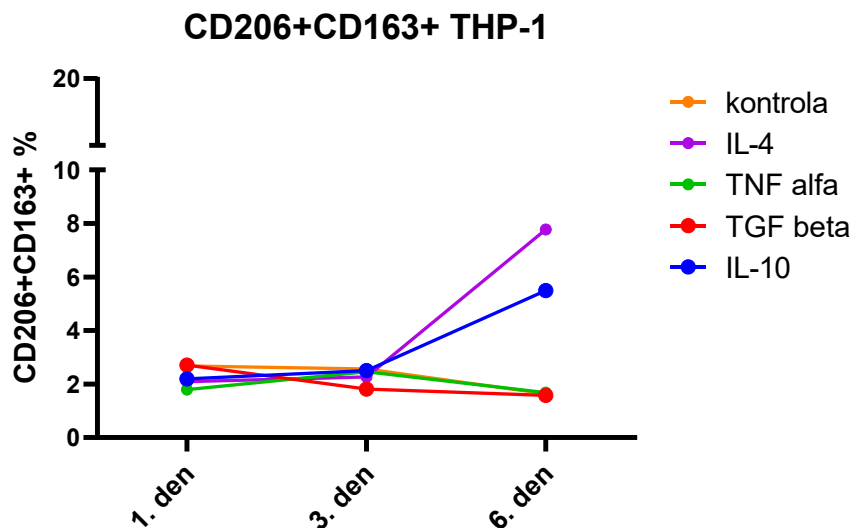
Graf 7 - Povrchová exprese molekuly CD206 (udávaná v %) na THP-1 buňkách, které byly stimulované IL-4 [20 ng/ml], TNF- α [10 ng/ml], TGF- β [20 ng/ml], a IL-10 [20 ng/ml].

Expresе znaku CD209 na THP-1 buňkách se použitými stimuly výrazně nezvyšovala. Mírný nárůst nastal při stimulaci pomocí TGF- β , ovšem ani tak, nejvyšší naměřená hodnota nedosáhla ani k 8 % pozitivitu pro tento znak (viz graf 8).



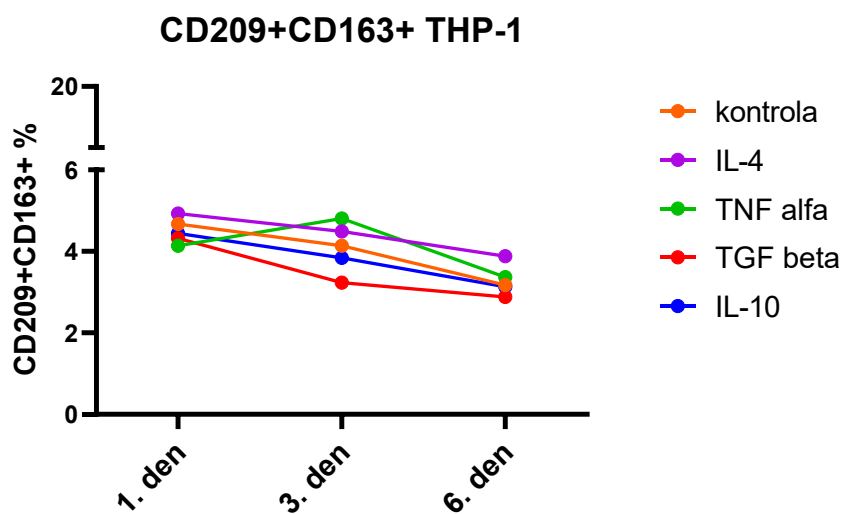
Graf 8 - Povrchová exprese molekuly CD209 (udávaná v %) na THP-1 buňkách, které byly stimulované IL-4 [20 ng/ml], TNF- α [10 ng/ml], TGF- β [20 ng/ml], a IL-10 [20 ng/ml].

Na grafu 9 je zobrazena koexpresе molekul CD206 a CD163 na THP-1 buňkách po stimulaci. Mezi 1. a 3. dnem nedošlo k viditelnému nárůstu koexpresе sledovaných znaků na stimulovaných buňkách. Mírné zvýšení nastalo mezi 3. a 6. dnem u THP-1 buněk stimulovaných pomocí IL-4 a IL-10.



Graf 9 - Povrchová koexprese molekul CD206 a CD163 (udávaná v %) na THP-1 buňkách, které byly stimulované IL-4 [20 ng/ml], TNF- α [10 ng/ml], TGF- β [20 ng/ml], a IL-10 [20 ng/ml].

Povrchová koexprese molekul CD209 a CD163 na stimulovaných THP-1 buňkách se významně nelišila od kontroly (nestimulovaných THP-1 buněk) v žádný z uvedených dnů (viz graf 10).



Graf 10 - Povrchová koexprese molekul CD209 a CD163 (udávaná v %) na THP-1 buňkách, které byly stimulované IL-4 [20 ng/ml], TNF- α [10 ng/ml], TGF- β [20 ng/ml], a IL-10 [20 ng/ml].

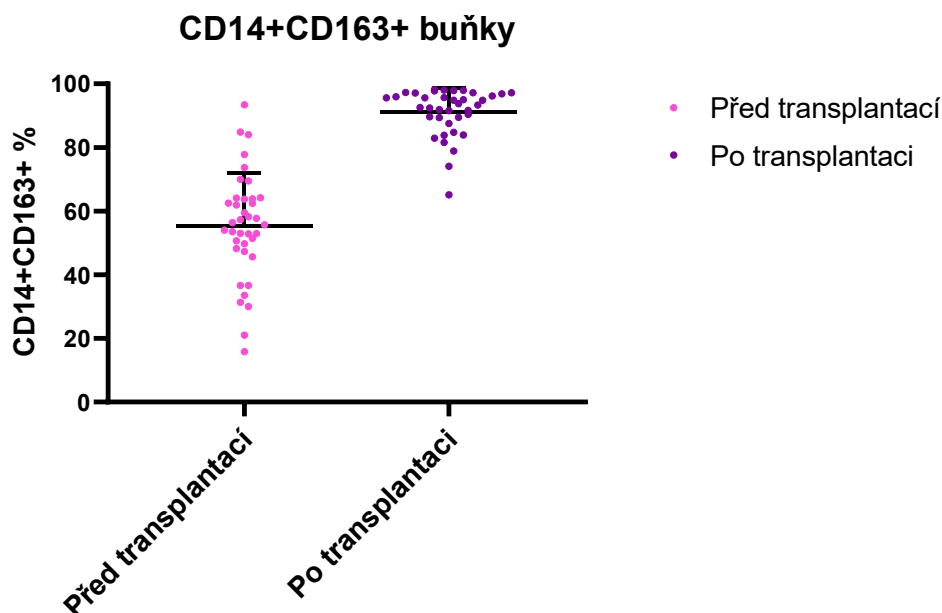
5.4 Povrchová exprese sledovaných znaků u pacientů před a po transplantaci ledvin

Do této testované skupiny bylo zařazeno 38 pacientů, kteří podstoupili transplantaci ledvin. Jednalo se o 20 mužů a 18 žen, přičemž průměrný věk mužů byl 51,05 let a průměrný věk žen byl 46,11 let. Těmto pacientům byl 2x odebrán vzorek krve (nesrážlivé, do zkumavky s přídavkem EDTA), poprvé v rámci předoperačního vyšetření a poté přibližně týden po transplantaci.

Bezprostředně před a časně po transplantaci se používá indukční léčba, která je založena zejména na depleci nebo bloádě funkce T-lymfocytů. Při vyšším riziku rejekce, nejčastěji u vysoce senzibilizovaných pacientů, je často nasazován antithymocytární globulin (ATG), pokud není riziko tak velké, přistupuje se např. k indukční léčbě pomocí monoklonální protilátky basiliximab, která je svým účinkem namířena proti receptoru pro IL-2 (CD25). Ze skupiny 38 pacientů byl u 28 pacientů zařazen ATG, u některých byl použit také Simulect (basiliximab), intravenózní Ig (IVIg) nebo byla v léčbě využita plazmaferéza.

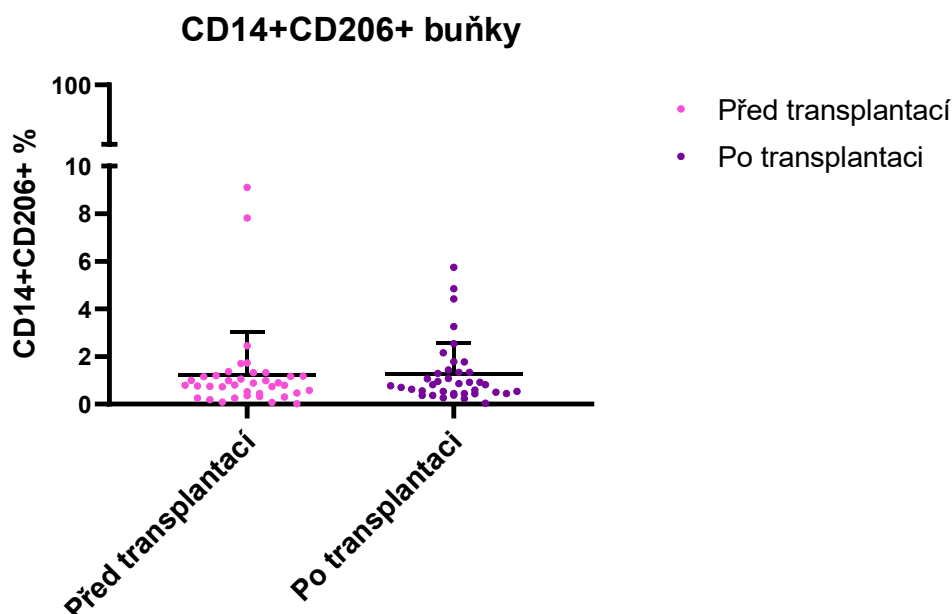
U 18 pacientů byla po transplantaci ledvin jako udržovací (popř. antirejekční) imunosupresivní léčba použita trojkombinace léčiv Advagraf, Myfortic, Prednison. U zbývajících byly zařazeny (nebo nahrazovaly výše zmíněné) ještě některé z těchto léčiv: Myfenax, Myclausen, Prograf, Simulect, Envarsus, Myfortic. Potransplantační rejekce nastala u poloviny sledovaných, tj. 19 operovaných pacientů (tento poměr neodpovídá reálnému procentu potransplantační rejekce u pacientů, jedná se o pacienty vybrané v náhodném pořadí).

Graf 11 zobrazuje porovnání exprese molekuly CD163 na CD14⁺ buňkách nesrážlivé krve u 38 pacientů před transplantací (krev odebrána při předoperačním vyšetření) a přibližně 1 týden po transplantaci ledvin. Exprese sledovaného znaku byla stanovena metodou průtokové cytometrie. U pacientů po transplantaci ledvin se výrazně zvýšila exprese molekuly CD163 oproti expresi této molekuly naměřené před transplantací ledvin.



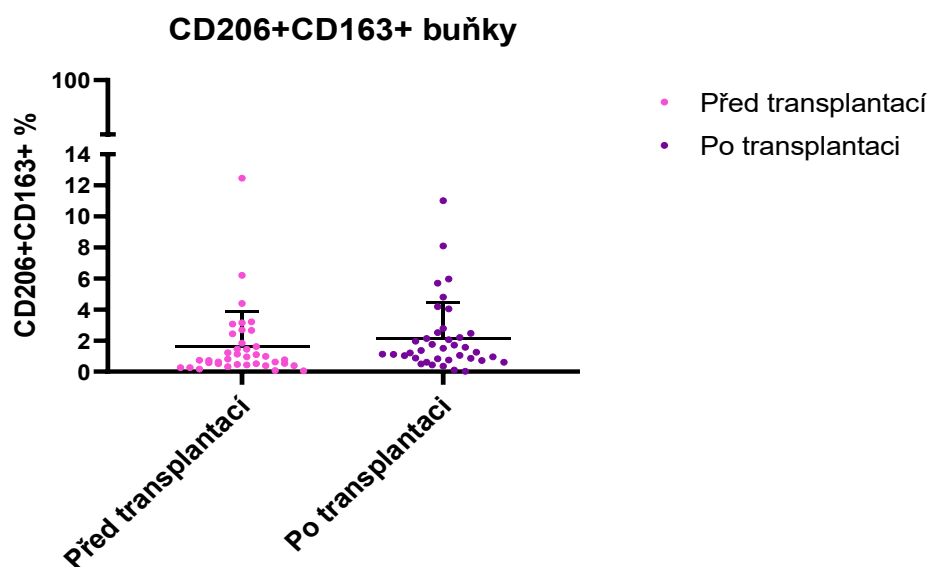
Graf 11 – Porovnání exprese molekuly CD163 (v %) na $CD14^+$ buňkách ze vzorku nesrážlivé krve u pacientů před a po transplantaci ledvin. Graf zobrazuje naměřené hodnoty pomocí průtokové cytometrie u 38 pacientů, přičemž je graficky vyznačena průměrná hodnota. Chybová úsečka udává směrodatnou odchylku měření.

U populace $CD14^+CD206^+$ buněk lidské nesrážlivé krve nenastal výraznější procentuální rozdíl mezi odběry před a po transplantaci ledvin. Výsledky měření jsou zobrazeny na grafu 12.



Graf 12 – Porovnání exprese molekuly CD206 (v %) na $CD14^+$ buňkách ze vzorku nesrážlivé krve u pacientů před a po transplantaci ledvin. Graf zobrazuje naměřené hodnoty pomocí průtokové cytometrie u 38 pacientů, přičemž je graficky vyznačena průměrná hodnota. Chybová úsečka udává směrodatnou odchylku měření.

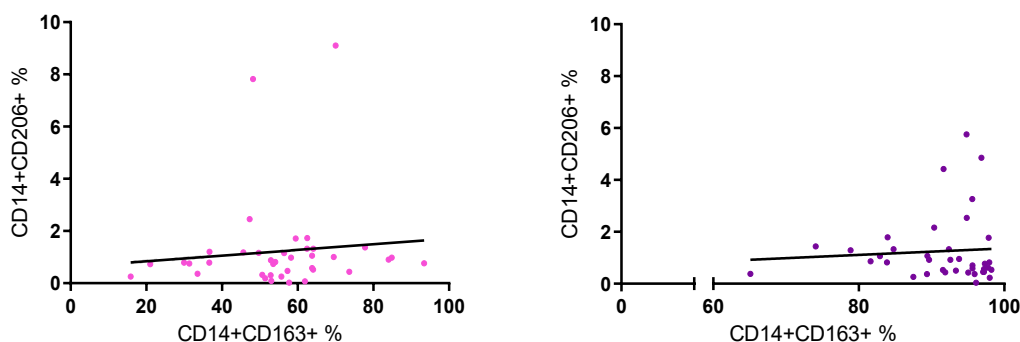
Na grafu 13 je zobrazeno porovnání koexprese molekul CD206 a CD163 na $CD14^+$ buňkách nesrážlivé krve u pacientů před a po transplantaci ledvin. Mezi těmito dvěma měřeními nenastal výraznější procentuální rozdíl.



Graf 13 – Porovnání koexprese molekul CD206 a CD163 (v %) na $CD14^+$ buňkách ze vzorku nesrážlivé krve u pacientů před a po transplantaci ledvin. Graf zobrazuje naměřené hodnoty pomocí průtokové cytometrie u 38 pacientů, přičemž je graficky vyznačena průměrná hodnota. Chybová úsečka udává směrodatnou odchylku měření.

Procentuální míra koexprese $CD14^+CD206^+$ buněk byla korelována s koexpresí $CD14^+CD163^+$ buněk u pacientů před (viz graf 14a) a po (viz graf 14b) transplantaci ledvin. Pearsonův korelační koeficient pro porovnání exprese sledovaných znaků u pacientů před transplantací je roven 0,1007. Hodnota tohoto koeficientu u pacientů po transplantaci je rovna 0,0716 což značí, že mezi expresí těchto znaků není žádná lineární závislost.

a) Korelace CD206+/CD163+ před transplantací b) Korelace CD206+/CD163+ po transplantaci



Graf 14 (a,b) – Zobrazení korelace $CD14^+CD206^+$ buněk ku $CD14^+CD163^+$ buňkám u 38 pacientů před (a) a po (b) transplantaci ledvin.

6 Diskuze

Jedním z úkolů této práce bylo vytvořit vhodný model, podle kterého by bylo možné diferenciovat monocyty *in vitro* směrem k M2 fenotypu. Tento fenotyp by měl být představován zejména zvýšenou expresí *scavenger* receptoru CD163 a manózového receptoru CD206 na modelových buňkách. Dále byla zkoumána exprese znaku CD209, který je znám jako marker prekurzorů DC v cirkulaci, ale je přítomen i na povrchu protizánětlivých makrofágů. Jako tyto modelové buňky sloužily THP-1 buňky a monocyty izolované z *buffy coatu*, které byly stimulovány IL-4 [20 ng/ml], TNF- α [10 ng/ml], TGF- β [20 ng/ml], a IL-10 [20 ng/ml].

Nejdříve byly používány pro pokus THP-1 buňky. Vyznačovaly se zejména stabilní životností a poměrně jednoduchým a rychlým způsobem množení, takže pro jednotlivé měření, jich bylo vždy dostatečné množství, což usnadnilo analýzu pomocí průtokové cytometrie. Pokus byl několikrát opakován se stejnými stimuly ve stejných koncentracích, ale výsledky nebyly vždy porovnatelné i při dodržení stejných podmínek.

K přiblížení fenotypu THP-1 buněk k fenotypu lidských makrofágů by mohlo dojít přidáním PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*). Tento vliv zkoumal Lund se svými kolegy (2016) a snažil se navrhnout optimální protokol diferenciaci THP-1 buněk a použitím PMA. Domníval se, že právě množství PMA hraje roli ve výsledných funkčních a fenotypických rozdílech mezi populacemi THP-1 buněk. Lund se svými kolegy použil jako prozánětlivý stimul LPS a zkoumal, jak závisejí změny v sekreci TNF- α na koncentraci použitého PMA. Jako ideální koncentraci PMA nakonec určil 25ng/ml.

PMA (mimo jiné) způsobí, že se THP-1 buňky chovají jako aktivované makrofágy a adherují ke dnu kultivační destičky. V jednom pokusu (jehož data nejsou publikována v této práci), bylo PMA zařazeno do diferenciačního protokolu a bylo zkoumáno, zda to bude mít vliv na reprodukovatelnost výsledků. K odloučení adherentních buněk byl použit roztok EDTA s 0,05% obsahem trypsinu. Pomocí tohoto roztoku však nedošlo k uvolnění takového množství buněk, které by stačovalo pro pokus. Proto byla vyzkoušena jiná metoda, a to použití sterilní škrabky. Pro porovnání účinnosti obou těchto metod, byly buňky stimulované za stejných podmínek stejnými stimuly v tzv. *doubletu*. Pro odloučení prvního *singletu* byl použit roztok

EDTA s 0,05% obsahem trypsinu a pro uvolnění druhého *singletu* byla použita sterilní škrabka. Výsledek nebyl uspokojivý ani v jenom z těchto případů, protože při použití roztoku EDTA s 0,05% obsahem trypsinu se neodloučilo dostatečné množství buněk (*gate* neobsahoval ani 100 buněk) a při použití sterilní škrabky byla velmi nízká životnost buněk (okolo 30 %). Proto byly v následujících experimentech jako modelové buňky testovány monocyty izolované z *buffy coatu*.

Izolované monocyty z *buffy coatu* se jeví jako lepší modelové buňky pro diferenciaci směrem k M2 fenotypu. Izolací bylo získáno okolo 20 % monocytů (což značí čistotu izolace). Jednou z nevýhod fenotypických vlastností těchto buněk může být, že se aktivují už procesem samotné izolace a také kontaktem s plastovým dnem kultivačních destiček. Takto aktivované monocyty adherují ke dnu nádoby a v den měření je potřeba je ze dna odloučit. K uvolnění buněk adherovaných ke dnu byl opět použit roztok EDTA s 0,05% obsahem trypsinu, který „narušil“ mezibuněčné spoje a uvolnil monocyty, které se staly součástí suspenze. Před použitím tohoto roztoku byly monocyty opláchnuty bezsérovým médiem, protože zbytky FBS mohou blokovat účinky trypsinu. Naopak po působení roztoku EDTA s 0,05% obsahem trypsinu bylo přidáno FBS, díky kterému nedošlo k narušení membránových antigenů a účinek nebyl protrahovaný. Další nevýhodou je celkově malé množství získaných buněk. Z jednoho odběru (od 1 dárce) na transfuzní stanici vznikne 1 přípravek *buffy coatu* o objemu 50 ml a díky případné neshodě krevních skupin a HLA antigenů není možné navýšit objem spojením několika vzorků.

Jako nejúčinnější stimul pro diferenciaci monocytů izolovaných z *buffy coatu* se jevil IL-10 [20 ng/ml]. Expres $CD14^{+}CD163^{+}$ buněk se významně zvýšila mezi 0. dnem (den samotné izolace) a 3. dnem po stimulaci, kdy bylo dosaženo maximální hodnoty. 6. den po stimulaci došlo k mírnému poklesu exprese, což bylo pravděpodobně zapříčiněno zhoršením životnosti těchto buněk. K významnému procentuálnímu nárůstu exprese došlo také u $CD14^{+}CD206^{+}$ buněk, kdy bylo opět dosaženo maxima 3. den po stimulaci IL-10 [20 ng/ml]. Stimulací pomocí IL-10 vzrostla také koexprese $CD206^{+}CD163^{+}$ buněk, a to opět zejména mezi 0. a 3. dnem po stimulaci. Při použití IL-4 jako stimulu, došlo také ke zvýšení exprese znaku CD206, ale s pozvolnějším nárůstem positivity než při stimulaci pomocí IL-10. Stimulací monocytů IL-4 vzrostla také exprese molekuly CD209.

Tedesco s kolegy (2015) také diferencioval makrofágy směrem k M2 fenotypu, a to pomocí stimulů IL-4 [20 ng/ml] a IL-13[5 ng/ml]. Expresi markerů M2 měřil metodou průtokové cytometrie po 48 hodinách, a poté po 7 dnech od stimulace. Měření po 48 hodinách od stimulace neukázalo zvýšení exprese znaků CD163 a CD206, zatímco po 7 dnech, došlo k procentuálnímu nárůstu populace CD206⁺ buněk. Ve výsledcích praktické části této diplomové práce bylo v souladu s touto prací rovněž potvrzeno, že exprese znaku CD206 výrazně vzrůstala až po 6. dnu od stimulace IL-4 [20 ng/ml].

Výsledky diferenciac THP-1 buněk nebyly tak uspokojivé jako získané hodnoty z diferenciac izolovaných monocytů z *buffy coatu*. Jak již bylo zmíněno, opakováním pokusu za stejných podmínek se nepovedlo dosáhnout srovnatelných výsledků. Procentuální změny positivity exprese sledovaných znaků nebyly zdaleka tak výrazné, jako u monocytární buněčné linie. K procentuálnímu nárůstu exprese CD14⁺CD163⁺ buněk došlo zejména při stimulaci pomocí IL-10, přičemž nejvyšší hodnota byla naměřena třetí den po stimulaci. Exprese CD14⁺CD206⁺ buněk se zvýšila hlavně při stimulaci pomocí TGF-β, přičemž největšího nárůstu bylo dosaženo mezi 3. a 6. dnem po stimulaci. Při použití TNF-α a TGF-β jako stimulů došlo k mírnému zvýšení procentuální exprese znaku CD209 na CD14⁺ buňkách. Při zkoumání koexprese znaků CD206 a CD163 na CD14⁺ buňkách se jevily jako nejúčinnější stimuly IL-4 a IL-10.

Srovnáváním modelů THP-1 buněk a lidských monocytů se zabýval také Daigneault se svými kolegy (2010). V jeho studii bylo také přidáno PMA do diferenciačního protokolu. Tento stimul indukoval změny v morfologii těchto buněk, což vykazovalo diferenciaci, která se ovšem nedala srovnávat s diferenciací lidských monocytů. U lidských monocytů (které byly obdobně získány izolací z krve zdravých dárců) byl zjištěn významný nárůst exprese CD206⁺ buněk, zatímco u THP-1 buněčné linie tento nárůst nenastal. Autoři se domnívají, že tyto výsledky svědčí spíše o klasické cestě aktivace. Jejich výsledky se dají klinicky porovnat spíše s tkáňově diferenciovanými makrofágy, jako jsou např. alveolární makrofágy. U jiných vysoce specializovaných makrofágů by bylo nutné změnit diferenciační protokol, který by přiblížil podmínky k podmínkám mikroprostředí v organismu.

Alves-Januzzi a kolegové (2017) se ve své studii také zabývali znaky typickými pro alternativně aktivované M2 makrofágy. Konkrétně zkoumali, zda dochází ke změně

exprese molekul CD206 a CD163 mezi izolovanými monocyty z periferní lidské krve a mezi těmito monocyty, které byly předem stimulované pomocí LPS. Poté přidali k nestimulovaným i preinkubovaným monocytům LPS v koncentraci 100 ng/ml (LPS byl přidán, aby tyto *in vitro* podmínky napodobily prostředí probíhajícího zánětu v organismu). K preinkubaci monocytů došlo přidáním LPS ve vzrůstajících koncentracích. Mezi expresí molekuly CD163 u nestimulovaných a LPS-stimulovaných monocytů nebyl pozorován žádný rozdíl. Exprese molekuly CD206 byla snižena u obou zkoumaných typů buněk.

V rámci této diplomové práce byla studována exprese molekuly CD163 spolu s expresí dalších sledovaných znaků (CD206, CD209) také *in vivo*, a to u pacientů před a po transplantaci ledvin. Do této skupiny pacientů bylo zahrnuto 38 osob z probíhající prospektivní studie monitorující fenotyp periferních monocytů po transplantaci ledviny. Pro významnost získaných výsledků by bylo vhodnější více dat (od více pacientů), nicméně byli zahrnuti pouze ti jedinci, u kterých byla data úplná a nenastala žádná chyba během technického zpracování těchto výsledků. U těchto pacientů, jejichž data byla použita, jsou kompletní záznamy o indukční a supresivní léčbě, dále byly úspěšně provedeny oba odběry krve (v den transplantace a přibližně 1 týden po transplantaci), data získaná pomocí průtokové cytometrie byla v pořádku zpracována, a současně u těchto pacientů byly k dispozici záznamy, zda došlo k potransplantační rejekci štěpu, či nikoli.

Výsledkem této *in vivo* studie bylo zejména zjištění významného procentuálního nárůstu exprese $CD14^{+}CD163^{+}$ buněk, což koreluje s daty, která byla získána v předchozí pilotní studii v roce 2014. Tato zmíněná práce se také zabývala zkoumáním fenotypu monocytů před a po transplantaci ledvin. Zjistilo se, že procento $CD14^{+}CD163^{+}$ monocytů je zvýšeno ihned po transplantaci a ke snížení nedochází ani během prvního měsíce po zákroku (Sekerková et al. 2014). Zda došlo ke snížení exprese těchto znaků i u pacientů zahrnutých v této diplomové práci nebylo zkoumáno.

Elabd s kolegy (2018) zjišťoval hladinu solubilní molekuly CD163 v séru pacientů po transplantaci ledvin. Snažil se určit, zda má přítomnost této molekuly souvislost s dysfunkcí transplantovaného orgánu a s případným rozvojem rezistence na inzulin. Metodou ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) bylo zjištěno, že hladina sCD163 může být používána jako predikční marker pro rejekci štěpu. Autoři se také domnívají, že indukce $CD163^{+}$ makrofágů a snížení hladiny prozánětlivých

monocytů by mohla pozitivně ovlivnit potransplantační stav. V této studii bylo také zjištěno, že zvýšená hladina sCD163 koreluje s rozvojem inzulinové rezistence a se vznikem *diabetu mellitu*. Naše předběžné výsledky neukazují závislost mezi membránovou expresí CD163 a sérovou hladinou solubilní formy.

Ikezumi a kolegové (2015) také zkoumali, zda hrají roli M2 makrofágy u rejekcí po transplantacích ledvin. Studovali výsledky biopsie transplantovaného štěpu u pacientů, kterým byla diagnostikována intersticiální fibróza a tubulární atrofie. Imunohistochemicky bylo zjištěna akumulace CD163⁺ buněk ve fibrotické tkáni a vzájemná významná korelace mezi těmito buňkami, parametry intersticiální fibrózy a mezi funkcí ledvin.

Zda infiltrace makrofágů souvisí s rejekcí po transplantacích ledvin zkoumal také Bergler se svými kolegy (2016). Ten se zaměřil na infiltraci makrofágů do transplantovaného štěpu během rejekce, zapříčiněné tvorbou protilátek a zprostředkované T-lymfocyty. Zjistilo se, že během tohoto typu rejekce opravdu dochází k infiltraci makrofágů do místa štěpu, ale u pacientů s intersticiální fibrózou a tubulární atrofií nebyla infiltrace prokázána.

To, zda v organismu dochází k polarizaci monocytů směrem k M1 nebo k M2 fenotypu zjišťoval také Fadini se svými kolegy (2014). Ten se konkrétně věnoval vlivu těchto populací makrofágů na vznik aterosklerózy. U myši již bylo prokázáno, že pokud je u nich zvýšená hodnota cholesterolu v krvi, tak dochází ke zvýšené tvorbě aterosklerotických plaků. V této studii bylo poprvé poukázáno na fakt, že poměr lidských M1/M2 makrofágů přímo koreluje s hladinami nízkodenzitního lipoproteinu (LDL) a také s tvorbou aterosklerotických plaků.

Alvarado-Vazquez s kolegy (2017) se zaměřil na indukci exprese molekuly CD163 pomocí speciální buněčné nanotechnologie. Jeho data ukazují, že indukce CD163⁺ buněk při zánětlivých stavech vyvolá změny v sekreci cytokinů, čímž dochází k modulaci na protizánětlivý fenotyp. Domnívá se, že indukce CD163⁺ makrofágů by mohla hrát roli v léčbě popálenin, u závažných pooperačních stavů nebo např. u revmatoidní artritidy.

7 Závěr

Při porovnání modelových buněk pro diferenciaci směrem k M2 fenotypu se jako vhodnější ukázaly lidské monocyty izolované z *buffy coatu*. Ke zvýšení exprese molekul CD163 a CD206 došlo zejména při stimulaci těchto buněk pomocí IL-10, přičemž maximální nárůst exprese byl zaznamenán 3. den po stimulaci. Zvýšení exprese CD206⁺ buněk nastalo také stimulací pomocí IL-4, přičemž maxima bylo dosaženo 6. den po stimulaci. THP-1 buňky se neprokázaly jako vhodný model pro stimulaci zejména proto, že naměřené výsledky byly nereprodukovatelné. Je možné, že by to mohlo být zapříčiněno tím, že se jedná o nádorovou buněčnou linii a vlastnosti těchto buněk se mění. U pacientů po transplantaci ledvin byl prokázán významný procentuální nárůst populace CD163⁺ buněk oproti hodnotě naměřené před transplantací. Bylo by zajímavé korelovat naměřené hodnoty u pacientů bez rejekce a u pacientů, u kterých potransplantační rejekce nastala. Pro toto porovnání není ještě nashromážděn dostatek dat, nicméně imunofenotypizace monocytů v průběhu rejekce alotransplantátu je hlavním cílem probíhající studie. Toto vyšetření je kromě pravidelných intervalů prováděno vždy v den diagnostické biopsie transplantované ledviny (při podezření na rejekci) a tyto výsledky teprve budou analyzovány. Zdá se, že detekce změn fenotypu monocytů včetně znaků CD163 a CD206 by mohla být diagnosticky významná u potransplantační rejekce a indukce CD163⁺ buněk může hrát úlohu v patofyziologii odpovědi imunitního systému proti transplantovanému štěpu.

8 Seznam zkratek a symbolů

7-AAD	7-aminoaktinomycin D
μm	Mikrometr
ADCC	<i>Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity</i> ; buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách
AP-1	Aktivační protein 1
APC	Antigen-prezentující buňky
Breg	B-regulační lymfocyty
CCD kamera	<i>Charge-coupled device</i> ; zařízení s vázanými náboji
CCL	Ligand chemokinu s C-C motivem
CCR	Chemokinový receptor s C-C motivem
CD	<i>Cluster of differentiation</i> ; diferenční skupina
CG oblast	Oblast DNA bohatá na páry cytosinu a guaninu
CMV	Cytomegalovirus
CX3CR	Chemokinový receptor s C-X3-C motivem
DC	<i>Dendritic cells</i> ; dendritické buňky
DC-SIGN	<i>Dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin</i> ; DC spec. adhezí molekula
DHRS9	Protein-kódující gen dehydrogenasy/reduktázy 9
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ; deoxyribonukleová kyselina
EBR	Erytrocyty bez buffy coatu resuspendované
EBV	Virus Epstein-Barrové
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> ; kys. ethylendiamintetraoctová
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> ; metoda sloužící k detekci a stanovení koncentrace antigenů nebo protilátek
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> ; typ fluorescenční cytometrie
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> ; fetální bovinní sérum
Fc část	Konstantní část molekuly imunoglobulinu

FcγRI	Fc gamma receptor I
FSC	<i>Forward scatter</i> ; přední rozptyl
GM-CSF	Granulocyty/makrofágy kolonie stimulující faktor
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> , virus lidské imunitní nedostatečnosti
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i> ; soubor antigenů hlavního histokompatibilního systému
HSP	<i>Heat shock proteins</i> ; proteiny teplotního šoku
IBD	<i>Inflammatory bowel disease</i> ; idiopatické střevní záněty
ICAM-1	Intracelulární adhezni molekula 1
IFN-γ	Interferon gamma
Ig	Imunoglobulin
IL	Interleukin
JAK-STAT	<i>Janus kinase / Signal transducers and activators of transcription</i> ; Janus kináza – signalizační přenašeč a aktivátor transkripčních proteinů
LBP	<i>Lipopolysaccharide binding protein</i> ; protein vážící lipopolysacharid
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> ; nízkodenzitní lipoprotein
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i> ; antigen asociovaný s funkcí lymfocytů
LIGHT (TNFSF14)	<i>TNF superfamily member 14</i> ; ligand patřící do rodiny TNF
LPS	Lipopolysacharid
Mac-1	Makrofág-1 antigen
M-CSF	Monocyty/makrofágy kolonie stimulující faktor
MFI	<i>Mean (median) fluorescence intensity</i> ; průměrná hodnota intenzity fluorescence
MHC	Major histocompatibility complex; hlavní histokompatibilní komplex
MPS	<i>Mononuclear phagocyte systém</i> ; systém mononukleárních fagocytů
Mreg	Regulační makrofágy
NADPH	Redukovaná forma koenzymu nikotinamidadenindinukleotidfosfátu
NF-κB	Nukleární faktor κB

NK buňky	<i>Natural killer cells</i> , přirození zabíječi
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i> ; molekulární vzory typické pro patogeny
PE	<i>Phycoerythrin</i> ; Fykoerytrin
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> ; fosfátový pufr
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i> ; receptory rozpoznávající molekulární vzory
RCF	<i>Relative centrifugal force</i> ; relativní centrifugační síla
RF-M	Reprogramující faktor makrofágů
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> ; Reaktivní formy kyslíku
RPMI	„ <i>Roswell Park Memorial Institute</i> “ médium
S1P	Sfingosin-1-fosfát
STAT-1	<i>Signal transducer and activator of transcription</i> ; vysílač signálu a aktivátor transkripce
SPHK1	Sfingokináza 1
SMAD	Rodina strukturně podobných proteinů, které jsou hlavním přenašečem signálů pro TGF- β
SSC	<i>Side scatter</i> ; boční rozptyl
TAM	<i>Tumor associated macrophages</i> , makrofágy asociované s tumorem
TCR	<i>T cell receptor</i> ; T-buněčný receptor
TGF- β	Transformující růstový faktor beta
Th buňky	<i>T-helper cells</i> ; T-pomocné lymfocyty
THP-1	Buněčná monocytární linie odvozená od chlapce s akutní myeloidní leukémií
TNF	Tumor nekrotizující faktor
Treg	T-regulační lymfocyty
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> ; angiogenetický růstový faktor

9 Seznam použité literatury

ABBAS, Abul, Andrew H. LICHTMAN a Shiv PILLAI, 2017. *Cellular and Molecular Immunology*. 9th edition. United States: Elsevier. ISBN 978-0-323-47978-3.

ALVARADO-VAZQUEZ, Perla Abigail, Laura BERNAL, Candler A. PAIGE, Rachel L. GROSICK, Carolina MORACHO VILRRIALES, David Wilson FERREIRA, Cristina ULECIA-MORÓN a E. Alfonso ROMERO-SANDOVAL, 2017. Macrophage-specific nanotechnology-driven CD163 overexpression in human macrophages results in an M2 phenotype under inflammatory conditions. *Immunobiology* [online]. 222(8–9), 900–912. ISSN 1878-3279. Dostupné z: doi:10.1016/j.imbio.2017.05.011

ALVES-JANUZZI, Amanda Barba, Milena Karina Colo BRUNIALTI a Reinaldo SALOMAO, 2017. CD163 and CD206 expression does not correlate with tolerance and cytokine production in LPS-tolerant human monocytes. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry* [online]. 92(3), 192–199. ISSN 1552-4957. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.b.21321

ANON., nedatováno. Analysis of Cell Viability using 7-Amino Actinomycin D (7-AAD): R&D Systems. *RD Systems a biotechnie brand* [online] [vid. 2018-11-24]. Dostupné z: <https://www.rndsystems.com/resources/protocols/analysis-cell-viability-using-7-amino-actinomycin-d-7-aad>

AREND, W. P., M. MALYAK, C. J. GUTHRIDGE a C. GABAY, 1998. Interleukin-1 receptor antagonist: Role in Biology. *Annual Review of Immunology* [online]. 16(1), 27–55. ISSN 0732-0582. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.27

AZAD, A. K., M. V. S. RAJARAM a R. S. SCHLESINGER, 2014. Exploitation of the Macrophage Mannose Receptor (CD206) in Infectious Disease Diagnostics and Therapeutics. *Journal of Cytology & Molecular Biology* [online]. 01(01). Dostupné z: doi:10.13188/2325-4653.1000003

BANASIK, Jacquelyn L., 2016. *Macrophage surface receptors: Inflammation and Immunity* [online]. Dostupné z: <https://basicmedicalkey.com/inflammation-and-immunity/#s0080>

BERG, Linda M. van den a Teunis B. H. GEIJTENBEEK, 2013. Antiviral Immune Responses by Human Langerhans Cells and Dendritic Cells in HIV-1 Infection. In: *HIV Interactions with Dendritic Cells* [online]. New York, NY: Springer New York, s. 45–70. ISBN 978-1-4614-4432-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4614-4433-6_2

BERGLER, Tobias, Bettina JUNG, Felix BOURIER, Louisa KÜHNE, Miriam C. BANAS, Petra RÜMMELE, Simone WURM a Bernhard BANAS, 2016. Infiltration of Macrophages Correlates with Severity of Allograft Rejection and Outcome in Human Kidney Transplantation. *PLOS ONE* [online]. 11(6), e0156900. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0156900

BHARADWAJ, Mandvi, Nicole A. MIFSUD a James MCCLUSKEY, 2012. Detection and characterisation of alloreactive T cells. *Methods in molecular biology* [online]. 882(309–37). Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-842-9_18

BISWAS, Subhra K. a Alberto MANTOVANI, 2014. *Macrophages: biology and role in the pathology of diseases*. New York: Springer.

BORTHWICK, L. A., 2016. The IL-1 cytokine family and its role in inflammation and fibrosis in the lung. *Seminars in Immunopathology* [online]. 38(4), 517–534. ISSN 1863-2297. Dostupné z: doi:10.1007/s00281-016-0559-z

BOSCH, T. P. P. van den, N. M. KANNEGIETER, D. A. HESSELINK, C. C. BAAN a A. T. ROWSHANI, 2017. Targeting the Monocyte–Macrophage Lineage in Solid Organ Transplantation. *Frontiers in Immunology* [online]. 8(153). ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2017.00153

BOSSHART, Herbert a Michael HEINZELMANN, 2016. THP-1 cells as a model for human monocytes. *Annals of translational medicine* [online]. 4(21)(438). Dostupné z: doi:10.21037/atm.2016.08.53

CLARK, I. A., 2007. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews* [online]. 18(3–4), 335–343. ISSN 13596101. Dostupné z: doi:10.1016/j.cytogfr.2007.04.002

CURI, Rui, Renata de Siqueira MENDES, Luiz Aurélio de Campos CRISPIN, Giuseppe Danilo NORATA, Sandra Coccuzzo SAMPAIO a Philip NEWSHOLME, 2017. A past and present overview of macrophage metabolism and functional outcomes. *Clinical Science* [online]. 131(12), 1329–1342. ISSN 0143-5221. Dostupné z: doi:10.1042/CS20170220

DAIGNEAULT, Marc, Julie A. PRESTON, Helen M. MARRIOTT, Moira K. B. WHYTE a David H. DOCKRELL, 2010. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PloS One* [online]. 5(1), e8668. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0008668

DELVES, Peter J., Seamus J. MARTIN, Dennis R. BURTON a Ivan M. ROITT, 2017. *Roitt's essential immunology*. Thirteenth edition. Chichester: Wiley Blackwell. ISBN 978-1-118-41577-1.

DEVITT, A., O. D. MOFFATT, Ch RAYKUNDALIA, J. D. CAPRA, D. L. SIMMONS a Ch D. GREGORY, 1998. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature*. 392, 505–509.

DEWOLF, S. a M. SYKES, 2017. Alloimmune T cells in transplantation. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 127(7), 2473–2481. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/JCI90595

EDWARDS, Justin P., Xia ZHANG, Kenneth A. FRAUWIRTH a David M. MOSSER, 2006. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *Journal of Leukocyte Biology* [online]. 80(6), 1298–1307. ISSN 07415400. Dostupné z: doi:10.1189/jlb.0406249

ELABD, Hazem, Hayam EL AGGAN, Sabah MAHMOUD a Heba EL SHAIR, 2018. SP689 serum soluble CD163 level in patients with renal transplantation: Relation to allograft function and survival and to insulin resistance. *Nephrology Dialysis*

Transplantation [online]. 33(suppl_1), i578–i578. ISSN 0931-0509. Dostupné z: doi:10.1093/ndt/gfy104.SP689

ENGERING, A., T. B. H. GEIJTENBEEK, S. J. van VLIET, M. WIJERS, E. van LIEMPT, N. DEMAUREX, A. LANZAVECCHIA, J. FRANSEN, C. G. FIGDOR, V. PIGUET a Y. van KOOYK, 2002. The Dendritic Cell-Specific Adhesion Receptor DC-SIGN Internalizes Antigen for Presentation to T Cells. *The Journal of Immunology* [online]. 168(5), 2118–2126. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.168.5.2118

ETZERODT, Anders a Søren K. MOESTRUP, 2013. CD163 and Inflammation: Biological, Diagnostic, and Therapeutic Aspects. *Antioxidants & Redox Signaling* [online]. 18(17), 2352–2363. ISSN 1523-0864. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2012.4834

FABRIEK, B. O., R. van BRUGGEN, D. M. DENG, A. J. M. LIGTENBERG, K. NAZMI, K. SCHORNAGEL, R. P. M. VLOET, C. D. DIJKSTRA a T. K. van den BERG, 2009. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood* [online]. 113(4), 887–892. ISSN 0006-4971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2008-07-167064

FADINI, Gian Paolo, Francesco SIMONI, Roberta CAPPELLARI, Nicola VITTURI, Silvia GALASSO, Saula VIGILI DE KREUTZENBERG, Lorenzo PREVIATO a Angelo AVOGARO, 2014. Pro-inflammatory monocyte-macrophage polarization imbalance in human hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Atherosclerosis* [online]. 237(2), 805–808. ISSN 1879-1484. Dostupné z: doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.10.106

GERBER, J. S. a D. M. MOSSER, 2001. Reversing Lipopolysaccharide Toxicity by Ligating the Macrophage Fc Receptors. *The Journal of Immunology* [online]. 166(11), 6861–6868. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.166.11.6861

GORDON, Siamon a Fernando O. MARTINEZ, 2010. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity* [online]. 32(5), 593–604. ISSN 10747613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2010.05.007

GUILLIAMS, Martin, Florent GINHOUX, Claudia JAKUBZICK, Shalin H. NAIK, Nobuyuki ONAI, Barbara U. SCHRAML, Elodie SEGURA, Roxane TUSSIWAND a Simon YONA, 2014. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nature Reviews Immunology* [online]. 14(8), 571–578. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri3712

HERRERA, O. B., D. GOLSHAYAN, R. TIBBOTT, F. S. OCHOA, M. J. JAMES, F. M. MARELLI-BERG a R. I. LECHLER, 2004. A Novel Pathway of Alloantigen Presentation by Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* [online]. 173(8), 4828–4837. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.173.8.4828

HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTŮŇKOVÁ, Tomáš BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK, 2017. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton. ISBN 978-80-7553-250-3.

CHAPEL, Helen, Mansel HAENEY, Siraj MISBAH a Neil SNOWDEN, 2018. *Základy klinické imunologie*. 6. vydání. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton. ISBN 978-80-7553-396-8.

IKEZUMI, Yohei, Toshiaki SUZUKI, Takeshi YAMADA, Hiroya HASEGAWA, Utako KANEKO, Masanori HARA, Toshio YANAGIHARA, David J. NIKOLIC-PATERSON a Akihiko SAITOH, 2015. Alternatively activated macrophages in the pathogenesis of chronic kidney allograft injury. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)* [online]. 30(6), 1007–1017. ISSN 1432-198X. Dostupné z: doi:10.1007/s00467-014-3023-0

JAGUIN, Marie, Noémie HOULBERT, Olivier FARDEL a Valérie LECUREUR, 2013. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cellular Immunology* [online]. 281(1), 51–61. ISSN 00088749. Dostupné z: doi:10.1016/j.cellimm.2013.01.010

KAUSHANSKY, Kenneth, Marshall A. LICHTMAN, Josef T. PRCHAL, Marcel M. LEVI, Oliver W. PRESS, Linda J. BURNS a Michael A. CALIGIURI, 2016. *Williams hematology*. 9th vyd. New York: McGraw-Hill. ISBN 978-0-07-183300-4.

KIESLICOVÁ, Eva, 2015. *Dárce orgánů*. 1. vydání. Praha: Maxdorf. ISBN 978-80-7345-451-7.

KOH, Timothy J. a Luisa Ann DIPIETRO, 2011. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Reviews in Molecular Medicine* [online]. 13. ISSN 1462-3994. Dostupné z: doi:10.1017/S1462399411001943

KREJSEK, Jan a Otakar KOPECKÝ, 2004. *Klinická imunologie*. 1. vyd. Hradec Králové: Nucleus HK. ISBN 80-86225-50-X.

KRIEGLER, M., C. PEREZ, K. DEFAY, I. ALBERT a S. D. LU, 1988. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: Ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* [online]. 53(1), 45–53. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/0092-8674(88)90486-2

KUHNS, M. S., M. M. DAVIS a K. Ch GARCIA, 2006. Deconstructing the Form and Function of the TCR/CD3 Complex. *Immunity* [online]. 24(2), 133–139. ISSN 10747613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2006.01.006

LAWSON, C. a S. WOLF, 2009. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacological reports*. 61(1), 22–32.

LEIBOVICH, S. J. a R. ROSS, 1975. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *The American Journal of Pathology*. 78(1), 71–100.

LUCAS, T., A. WAISMAN, R. RANJAN, J. ROES, T. KRIEG, W. MULLER, A. ROERS a S. A. EMING, 2010. Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair. *The Journal of Immunology* [online]. 184(7), 3964–3977. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.0903356

LUND, Maria E., Joyce TO, Bronwyn A. O'BRIEN a Sheila DONNELLY, 2016. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *Journal of Immunological Methods* [online]. 430, 64–70. ISSN 1872-7905. Dostupné z: doi:10.1016/j.jim.2016.01.012

MALYSHEV, Igor a Yuri MALYSHEV, 2015. Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage “Switch” Phenotype. *BioMed Research International* [online]. 2015(Article ID 341308), 1–22. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2015/341308

MANTOVANI, A., A. SICA, S. SOZZANI, P. ALLAVENA, A. VECCHI a M. LOCATI, 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* [online]. 25(12), 677–686. ISSN 14714906. Dostupné z: doi:10.1016/j.it.2004.09.015

MASSAGUÉ, J., 2012. TGF β signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 13(10), 616–630. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm3434

MERINO, Ana, Paula BUENDIA, Alejandro MARTIN-MALO, Pedro ALJAMA, Rafael RAMIREZ a Julia CARACEDO, 2011. Senescent CD14+CD16+ Monocytes Exhibit Proinflammatory and Proatherosclerotic Activity. *The Journal of Immunology* [online]. 186(3), 1809–1815. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001866

MINTY, A., P. CHALON, J.-M. DEROCQ, X. DUMONT, J.-C. GUILLEMOT, M. KAGHAD, C. LABIT, P. LEPLATOIS, P. LIAUZUN, B. MILOUX, C. MINTY, P. CASELLAS, G. LOISON, J. LUPKER, D. SHIRE, P. FERRARA a D. CAPUT, 1993. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature* [online]. 362(6417), 248–250. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/362248a0

MOSSER, D. M. a X. ZHANG, 2008. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunological Reviews* [online]. 226(1), 205–218. ISSN 01052896. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00706.x

MOSSER, David M. a Justin P. EDWARDS, 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology* [online]. 8(12), 958–969. ISSN 1474-1733. Dostupné z: doi:10.1038/nri2448

MURPHY, Kenneth a Casay WEAVER, 2017. *Janeway's immunobiology*. 9th edition. New York: Garland Science. ISBN 978-0-8153-4505-3.

MURRAY, Peter J., Judith E. ALLEN, Subhra K. BISWAS, Edward A. FISHER, Derek W. GILROY, Sergij GOERDT, Siamon GORDON, John A. HAMILTON, Lionel B. IVASHKIV, Toby LAWRENCE, Massimo LOCATI, Alberto MANTOVANI, Fernando O. MARTINEZ, Jean-Louis MEGE, David M. MOSSER, Gioacchino NATOLI, Jeroen P. SAEIJ, Joachim L. SCHULTZE, Kari Ann SHIREY, Antonio SICA, Jill SUTTLES, Irina UDALOVA, Jo A. van GINDERACHTER, Stefanie N. VOGEL a Thomas A. WYNN, 2014. Macrophage Activation and

Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* [online]. 41(1), 14–20. ISSN 10747613. Dostupné z: doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008

NELMS, Keats, Achsah D. KEEGAN, José ZAMORANO, John J. RYAN a William E. PAUL, 1999. The IL-4 receptor: Signaling Mechanisms and Biologic Functions. *Annual Review of Immunology* [online]. 17(1), 701–738. ISSN 0732-0582. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.701

OWEN, Judith A., Jenni PUNT a Sharon A. STRANFORD, 2013. *Kuby Immunology*. 7th edition. New York: W.H. Freeman and Company. ISBN 978-1-4641-3784-6.

PARHAM, Peter a Charles JANEWAY, 2015. *The immune system*. Fourth edition. New York, NY: Garland Science, Taylor & Francis Group. ISBN 978-0-8153-4527-5.

RAZAGHI, A., L. OWENS a K. HEIMANN, 2016. Review of the recombinant human interferon gamma as an immunotherapeutic: Impacts of production platforms and glycosylation. *Journal of Biotechnology* [online]. 240, 48–60. ISSN 01681656. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2016.10.022

RIQUELME, Paloma, Giada AMODIO, Camila MACEDO, Aurelie MOREAU, Nataša OBERMAJER, Christoph BROCHHAUSEN, Norbert AHRENS, Tuija KEKARAINEN, Fred FÄNDRICH, Cristina CUTURI, Silvia GREGORI, Diana METES, Hans J. SCHLITT, Angus W. THOMSON, Edward K. GEISLER a James A. HUTCHINSON, 2017. DHRS9 Is a Stable Marker of Human Regulatory Macrophages. *Transplantation* [online]. 101(11), 2731–2738. ISSN 0041-1337. Dostupné z: doi:10.1097/TP.0000000000001814

ROBINSON, P. N., E. ARTEAGA-SOLIS, C. BALDOCK, G. COLLOD-BEROU, P. BOOMS, A. De PAEPE, H. C. DIETZ, G. GUO, P. A. HANDFORD, D. P. JUDGE, C. M. KIELTY, B. LOEYS, D. M. MILEWICZ, A. NEY, F. RAMIREZ, D. P. REINHARDT, K. TIEDEMANN, P. WHITEMAN a M. GODFREY, 2006. The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *Journal of Medical Genetics* [online]. 43(10), 769–787. ISSN 1468-6244. Dostupné z: doi:10.1136/jmg.2005.039669

ROEBUCK, K. A. a A. FINNEGAN, 1999. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *Journal of leukocyte biology*. 66(6), 876–888.

SEKERKOVÁ, Alena, Eva KREPSOVÁ, Eva BRABCOVÁ, Jana SLATINSKÁ, Ondřej VIKLICKÝ, Věra LÁNSKÁ a Ilja STRÍŽ, 2014. CD14+CD16+ and CD14+CD163+ monocyte subpopulations in kidney allograft transplantation. *BMC Immunology* [online]. 2014. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2172-15-4

SCHOENBORN, J. R. a Ch B. WILSON, 2007. Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses. In: [online]. B.m.: Elsevier, s. 41–101. ISBN 978-0-12-373709-0. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2776(07)96002-2

SCHRAMA, D., R. A. REISFELD a J. C. BECKER, 2006. Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. 5(2), 147–159. ISSN 1474-1776. Dostupné z: doi:10.1038/nrd1957

SIEWEKE, M. H. a J. E. ALLEN, 2013. Beyond Stem Cells: Self-Renewal of Differentiated Macrophages. *Science* [online]. 342(6161). ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1242974

STŘÍŽ, Ilja, Eva BRABCOVÁ, Libor KOLESÁR a Alena SEKERKOVÁ, 2014. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clinical Science* [online]. 126(9), 593–612. ISSN 0143-5221. Dostupné z: doi:10.1042/CS20130497

STŘÍŽ, Ilja a Vladimír HOLÁŇ, 2015. *Cytokiny v klinické medicíně*. 1. vydání. Praha: Maxdorf. ISBN 978-80-7345-427-2.

TAYLOR, P. R., L. MARTINEZ-POMARES, M. STACEY, H.-H. LIN, G. D. BROWN a S. GORDON, 2005. Macrophage receptors and immune recognition. *Annual Review of Immunology* [online]. 23(1), 901–944. ISSN 0732-0582. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816

TEDESCO, Serena, Chiara BOLEGO, Alice TONIOLO, Alberto NASSI, Gian Paolo FADINI, Massimo LOCATI a Andrea CIGNARELLA, 2015. Phenotypic activation and pharmacological outcomes of spontaneously differentiated human monocyte-derived macrophages. *Immunobiology* [online]. 220(5), 545–554. ISSN 1878-3279. Dostupné z: doi:10.1016/j.imbio.2014.12.008

TESAŘ, Vladimír a Ondřej VIKLICKÝ, 2015. *Klinická nefrologie*. 2., zcela přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-4367-7.

THOMAS, Graham, Robert TACKE, Catherine C. HEDRICK a Richard N. HANNA, 2015. Nonclassical Patrolling Monocyte Function in the Vasculature. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. 35(6), 1306–1316. ISSN 1079-5642. Dostupné z: doi:10.1161/ATVBAHA.114.304650

THOMSEN, Jens Haugbølle, Anders ETZERODT, Pia SVENDSEN a Søren K. MOESTRUP, 2013. The Haptoglobin-CD163-Heme Oxygenase-1 Pathway for Hemoglobin Scavenging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2013, 1–11. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.1155/2013/523652

WOLLENBERG, Andreas, Tilmann OPPEL, Eva-Maria SCHOTTDORF, Sandra GÜNTHER, Martina MODERER a Mieke MOMMAAS, 2002. Expression and Function of the Mannose Receptor CD206 on Epidermal Dendritic Cells in Inflammatory Skin Diseases. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 118(2), 327–334. ISSN 0022-022X. Dostupné z: doi:10.1046/j.0022-202x.2001.01665.x

WRIGHT, S., R. RAMOS, P. TOBIAS, R. ULEVITCH a J. MATHISON, 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* [online]. 249(4975), 1431–1433. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1698311

YANG, Li a Yi ZHANG, 2017. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *Journal of Hematology & Oncology* [online]. 10(1). ISSN 1756-8722. Dostupné z: doi:10.1186/s13045-017-0430-2

ZHANG, Y., Ch C. BOESEN, S. RADAEV, A. G. BROOKS, W.-H. FRIDMAN, C. SAUTES-FRIDMAN a P. D. SUN, 2000. Crystal Structure of the Extracellular Domain of a Human Fc γ RIII. *Immunity* [online]. 13(3), 387–395. ISSN 10747613. Dostupné z: doi:10.1016/S1074-7613(00)00038-8

ZIEGLER-HEITBROCK, Loems, 2015. Blood monocytes and their subsets: established features and open questions. *Frontiers in Immunology* [online]. 6(423). Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2015.00423